Facultad de Química.
Departamento de Química Orgánica.
Universidad de Santiago de Compostela.

Búsqueda de inhibidores multidiana para BACE-1 y otras dianas farmacológicas de la enfermedad de Alzheimer.

On the search for multitarget inhibitors for BACE-1 and other pharmacological targets of Alzheimer's Disease.

José Luis Domínguez Meijide

Santiago de Compostela, Mayo de 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Facultad de Química.
Departamento de Química Orgánica.
Universidad de Santiago de Compostela.

María del Carmen Villaverde Cameron-Walker, Catedrática del departamento del Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela; Ramón José Estévez Cabanas, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela; Fredy Sussman, Investigador del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN

Que la presente memoria, titulada: " Búsqueda de inhibidores multidiana para BACE-1 y otras dianas farmacológicas de la enfermedad de Alzheimer.", realizada por el doctorando Jose Luis Domínguez Meijide para optar al grado de Doctor, reúne todos los requisitos y condiciones necesarias como trabajo de Tesis Doctoral.

Y para que conste, dan el visto bueno para su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela.

En Santiago de Compostela, a 16 de mayo de 2014

M. del Carmen Villaverde Ramón. J. Estévez Fredy Sussman

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de Tesis, Maricarmen, Fredy, y Ramón, por su ayuda y dedicación, sin la cual este trabajo no habría resultado posible.

I would like to thank professor Amedeo Caflisch, for giving me the opportunity of an abroad stay with his research group in Zurich.

Quisiera dar las gracias a mis compañeros de laboratorio durante el proyecto de fin de carrera y el proyecto de máster: Fernando, Begoña, Amalia, Lucía, Jose Manuel, Thomas, y Noel; así como a mi director en estos proyectos, Juan Carlos Estévez. Quisiera dar también las gracias a los alumnos de máster con los que he compartido laboratorio durante la tesis: Jesus, Helena, Bea, Cristina y Óscar. And I'd also like to thank my lab partners at Zurich, specially Tim, Andrea, Sandra and Nico.

También quisiera agradecer a todos nuestros colaboradores por la ayuda prestada en el desarrollo de nuestros experimentos: a la profesora Helena Danielson y su grupo; a Javier Sardina, Rita Paleo y su grupo; a Angelo Carotti y su grupo; y a Marian Castro y su grupo.

Por último, y por ello más importante, quisiera agradecer a mis padres, Antonio y Adoración, por estar siempre ahí; a mi hermano Tonio, por aguantarme; y a mis abuelas Maruja y Chelo, por no cejar nunca en su empeño de verme afeitado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Dedicada aos meus pais e ao meu irmán.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"With Magic, you can turn a frog into a prince. With science, you can turn a frog into a PhD, and you keep the frog you started with."

-- Terry Prattchet.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Glosario de abreviaturas y léxico	xv
Thesis Abstract	xix
Capítulo 1. Introducción de la tesis	1
1.1.- La enfermedad de Alzheimer. Alcance y coste social	3
1.2.- Una retrospectiva sobre la enfermedad de Alzheimer	4
1.3.- Causas de la enfermedad de Alzheimer	5
1.3.1.- La hipótesis β-amiloide	5
1.3.2.- La hipótesis Tau	7
1.4.- Tratamiento y prevención	9
1.4.1.- La terapia colinérgica	9
1.4.2.- Otras terapias. Fármacos en pruebas clínicas. Prevención	9
1.5.- Dianas farmacológicas de la cascada β-amiloide	11
1.5.1.- Enzima β-secretasa	11
1.5.2.- Agregados β-amiloides.	15
1.5.3.- Enzima Acetilcolinesterasa.	17
1.5.4.- Enzima Butirilcolinesterasa.	19
1.5.5.- Otras dianas. α-secretasa y γ-secretasa.	20
1.6.- Inhibidores Multidiana.	22
Capítulo 2. Objetivos. // Chapter 2. Objectives.	23
Capítulo 3. Estudios sobre las aspartil proteasas.	27
3.1.- Introducción del capítulo.	29
3.1.1.- Una breve descripción de las aspartil proteasas.	29
3.1.2.- Mecanismo catalítico de las aspartil proteasas.	31
3.1.3.- Efectos del inhibidor en el estado de protonación del sitio activo de las aspartil proteasas	32
3.1.4.- Aproximaciones experimentales. Nuevas rutas de predicción del estado de carga de las aspartil proteasas. La aproximación SPR/MM	34
3.2.- Estudios sobre BACE-1.	35
3.2.1.- Metodología.	35
3.2.1.1.- Analisis de Interacciones con biosensores de SPR y estudios de actividad celular	35
3.2.1.2.- Protocolos de simulación para la predicción del pK_a y afinidad de enlace	37
3.2.1.3.- Protocolo de estudio de inhibidores con isósteros tipo hidroxietileno.	39
3.2.2.- Resultados y discusión.	40
3.2.3.- Conclusiones de los estudios sobre BACE-1.	46
3.3.- Estudios sobre HIV-1 PR.	48
3.3.1.- Metodología.	48
3.3.1.1.- Análisis de interacción con el biosensor SPR y análisis de los datos de interacción de SPR	48
3.3.1.2.- Preparación de modelos, estudios de pK_a, y predicción de afinidades.	48
3.3.2.- Resultados y discusión.	51
3.3.3.- Conclusiones de los estudios sobre HIV-1 PR.	59
3.4.- Discusión y conclusiones del globales.	60

Capítulo 4. Estudios sobre el efecto del pH en el *docking* para BACE-1.	63
4.1. - Introducción del capítulo.	65
4.2. - Metodología.	66
4.2.1.- Selección y preparación de candidatos.	66
4.2.2.- Acoplamiento y reevaluación.	69
4.2.3.- Funciones de evaluación.	70
4.2.3.1.- Chemscore.	70
4.2.3.2.- Goldscore.	70
4.2.3.3.- ChemPLP.	71
4.2.3.4.- Charmm y h.Charmm.	71
4.2.4.- Evaluación de los resultados de acoplamiento.	72
4.3. - Resultados.	73
4.3.1.- Estado de protonación de los inhibidores y los residuos ionizables de BACE-1	73
4.3.2.- Efecto del estado de protonación del inhibidor y la carga de los residuos de la proteína en los resultados de acoplamiento.	75
4.3.3.- Ejemplo de la dependencia de la afinidad con el pH.	81
4.3.4.- Grado de éxito de los diferentes ligandos.	82
4.4.- Discusión.	84
4.4.1.- Protonación de BACE-1 y ligandos.	84
4.4.2.- Resultados de acoplamiento.	85
4.5.- Conclusiones.	89
4.6.- Anexo. p*K*a de los grupos ácidos en función del complejo.	91
Capítulo 5. Búsqueda de cabezas de serie multidiana para la enfermedad de Alzheimer	95
5.1.- Introducción del capítulo.	97
5.2.- Metodología.	99
5.2.1.- Selección de Candidatos.	99
5.2.2.- Simulación de acoplamiento proteína-ligando. *Docking*.	99
5.2.2.1.- Acoplamiento en BACE-1.	100
5.2.2.2.- Acoplamiento en AChE.	101
5.2.3.- Estudios de inhibición de agregación.	102
5.2.4.- Síntesis de candidatos.	103
5.2.5.- Evaluación experimental.	103
5.3.- Resultados y discusión I. Cumarinas.	104
5.3.1.- Estudios de acoplamiento en BACE-1.	104
5.3.2.- Estudios de acoplamiento en AChE.	107
5.3.3.- Estudios de inhibición de agregación a nivel monomérico.	109
5.3.4.- Síntesis de cumarinas.	112
5.3.5.- Resultados Experimentales.	112
5.4.- Resultados y discusión II. Carbazoles.	114
5.4.1.- Estudios de acoplamiento en BACE-1.	115
5.4.2.- Estudios de Acoplamiento en AChE.	122
5.4.3.- Estudios de inhibición de agregación a nivel monomérico	125
5.4.4.- Síntesis de carbazoles.	128
5.4.5.- Resultados Experimentales	128

5.5.- Resultados y discusión III. Indoles.	129
5.5.1.- Estudios de acoplamiento en BACE-1.	130
5.5.2.- Estudios de Acoplamiento en AChE.	134
5.5.3.- Estudios de inhibición de agregación a nivel monomérico.	141
5.5.4.- Síntesis de indoles.	143
5.5.5.- Resultados Experimentales.	143
5.6.- Discusión y Conclusiones.	144
5.7.- Anexo 1. Gráficas comparativas de Carbazoles e Indoles.	148
Anexo 2. Funcionamiento de AWK.	154
Chapter 6. Thesis Conclusions.	155
6.1.- Binding affinity pH dependence in aspartic proteases.	157
6.2.- Effect of the ligand and enzyme charge states on fragment self-docking performance to BACE-1.	158
6.3.- Search for multitarget AD drug leads.	160
Índice de Referencias.	163
Thesis Appendix. Publications	167

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Glosario de Abreviaturas y léxico.

ACh: A*cetyl*Ch*oline*, Acetilcolina.

AChE: A*cetyl*Ch*olin*E*sterase,* enzima Acetilcolinesterasa.

Acoplamiento, autoacoplamiento, acoplamiento cruzado: Véase *Docking*.

AD: *Alzheimer's Disease*. Alternativo a EA.

Apo: En el contexto de estructuras de proteínas, aquella que se encuentra en estado libre, sin inhibidor enlazado.

APP: *Amyloid Precursor Protein*, proteína precursora amiloide.

BACE-1: *Beta Amyloid Cleaving Enzyme 1*. Nombre con el que se referirá a la enzima β-secretasa o memapsin-2 a lo largo del documento.

BuChE: But*yryl*Ch*olin*E*sterase*, butirilcolinesterasa.

CAS: C*atalytic* A*nionic* S*ubsite.* Sitio Aniónico Catalítico, una región del sitio activo de AChE cercana al canal que comunica dicho sitio activo de AChE con el entorno.

ChemScore: A veces referida como *Chem*, es una posible función de scoring para emplear en estudios de acoplamiento. Ver capítulo 3 para una explicación más exhaustiva.

ChemPLP: A veces referida como PLP, es una posible función de scoring para emplear en estudios de acoplamiento. Ver capítulo 3 para una explicación más exhaustiva.

CPIRpK: *Calculate Protein Ionization and Residue* pK_a. Función de cálculo disponible en el software Discovery Studio, empleada para la estimación de valores de pK_a en función del microentorno polar de residuos ácidos y básicos en proteínas.

Cutoff: Punto de corte. En el contexto de los cálculos de mecánica molecular, se refiere al valor o distancia a partir de la cual las energías de interacción entre dos átomos se desestiman.

DM*:* Dinámica molecular. Alternativo a MD.

Docking: Simulación computacional que proporciona, en base a los términos de la función de *Scoring* empleada, una serie de posibles posiciones que un ligando puede ocupar en el sitio activo definido para una enzima, sobre la que se realiza la simulación computacional. También referido como "acoplamiento". *Self-docking* (autoacoplamiento) y *cross-docking* (acoplamiento cruzado) se refieren, respectivamente, a las simulaciones de acoplamiento de un ligando sobre la proteína en la estructura complejo nativo que contiene a ambos y el acoplamiento de un ligando sobre una proteína en una configuración distinta a la del complejo nativo.

EA: Enfermedad de Alzheimer. Alternativo a AD

Flap: Empleado en relación a BACE-1, éste término se refiere a la horquilla β flexible compuesta por los residuos Val69 a Lys75 de la cadena del dominio catalítico, cercana al sitio activo.

FRET: *Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer,* o Transmisión de Energía de Resonancia. Mecanismo de transferencia de energía de cromóforos empleado como herramienta de medición de afinidades.

Función de Evaluación/Función de *Scoring*: A veces referida como técnica de *Scoring* o técnica de evaluación, se refiere al conjunto de sistemas que definen y ajustan los pesos de los distintos tipos de interacción inhibidor/proteína en cálculos de acoplamiento para determinar los resultados de éstos.

GBSW: Generalized Born with a Simple Switching. Modelo de simulación de solvatación implícita empleado en diversos métodos computacionales de la tesis para simular los efectos del entorno en las proteinas estudiadas.

GoldScore: A veces referida como Gold, es una posible función de scoring para emplear en estudios de acoplamiento. Ver capítulo 4 para una explicación más exhaustiva.

Hit: En simulaciones de acoplamiento, término empleado para referirse a una posición de salida que cumple los criterios establecidos de patrón de contactos entre el candidato a inhibidor y la proteína sobre la que se realiza la simulación de acoplamiento.

HIV: H*uman* I*nmunodeficiency* V*irus*. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

HIV-1 PR: H*uman* I*nmunodeficiency* V*irus* P*rotease.* Proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana.

Holo: En el contexto de estructuras de proteínas, aquella que se encuentra enlazada a un inhibidor.

IC_{50}: Valor de concentración al que el ligando consigue inhibir la actividad de la enzima en un 50%, para análisis *in vitro*.

K_D: Constante de disociación. Un tipo específico de constante de equilibrio que mide la tendencia de un complejo a separarse en su proteína y ligando componentes.

K_i: Constante de inhibición. Un tipo específico de constante de equilibrio que mide la efectividad del ligando a la hora de inhibir la actividad catalítica de un enzima.

LBHB: Low Barrier Hydrogen Bond. Enlace de hidrógeno de barrera baja. Un tipo específico de enlace de hidrógeno donde el átomo de hidrógeno se encuentra enlazado con igual intensidad a ambos átomos pesados mediante un efecto de túnel cuántico, que permite que los átomos pesados se sitúen más próximos entre sí de lo que es viable en un enlace de hidrógeno estándar.

MD: Molecular Dynamics. Alternativo a DM.

NGF: N*eural* G*rowth* F*actors*. Factores de crecimiento Neuronal.

NFT: N*euro*F*ibrillary* T*angle*. Ovillo Neurofibrilar.

PAS: P*eripheral* A*nionic* S*ite*. Sitio Aniónico Periférico, la región externa del canal que comunica el sitio activo de AChE con el entorno.

PDB: *Protein Data Bank.* Un catálogo abierto al público de diversas estructuras experimentales de proteínas, complejos, péptidos y otras sustancias obtenidas mediante cristalografía de rayos X y otros métodos. Disponible en http://www.rcsb.org

RMSD: *Root Mean Square Deviation*. Raíz cuadrada de la desviación de la media al cuadrado. Medida de desviación empleada para la valoración de resultados de autoacoplamiento.

SPR: Surface Plasmon Resonance, Resonancia de Plasmón de Superficie. Técnica de determinación de afinidades. Véase capítulo 3 para una explicación más exhaustiva.

Tc: *Torpedo Californica*.

*Tc*AChE: Estructura de Acetilcolinesterasa extraída de la *Torpedo californica.*

Técnica de *Scoring/*evaluación: Véase función de *Scoring*.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Thesis Abstract.

Alzheimer disease (AD), the main cause of dementia in the elderly, is a neurodegenerative pathology characterized by the progressive formation of insoluble amyloid plaques and fibrillary tangles. In spite of the enormous research efforts by academic institutions and pharmaceutical industry, AD is an illness with unmet needs since the only drugs available in clinic (i.e., AChE inhibitors) have a palliative effect and do not modify the course of the disease.

The most accepted hypothesis for the origin of AD is the one related to the amyloid cascade paradigm, which singles out the aggregates and fibrils of the β-amyloid peptide (Aβ-42), a peptide of 42 residues, as AD's causal agent. The Aβ peptides originate by the hydrolysis of the amyloid precursor protein (APP) by two aspartic proteases (γ-secretase and BACE-1, also known as β-secretase). The last decade has witnessed an all out effort to discover inhibitors of these two enzymes that could become drug leads for the treatment of AD, but all the candidates have failed either at pre-clinical o clinical stages. The inhibition of Aβ peptide aggregation has become as well an important target for drug lead discovery, although no Aβ inhibitor has surpassed the clinical assays either. Lastly, different studies have shown that the peripheral anionic site (PAS) in acetyl-cholinesterase (AChE) is a chaperone for the β-amyloid peptide aggregation and hence its inhibition could hinder this process.

The multiplicity of amyloid cascade AD targets (described above) opens the door to a new approach based on single molecule polypharmacology, which entails the search of a molecule that could bind all or some targets of the amyloid cascade. This novel paradigm, which deviates radically from the "one target, one molecule" strategy, has been barely researched, probably due to the mayor structural and sequence specificity differences amongst the binding sites of the amyloid cascade targets, which hinders drastically this therapeutic strategy.

In this thesis, we will describe a series of studies carried on with the ultimate objective of developing a set of multi-target drug candidates for the treatment of AD. To reach this final objective, we established and met a series of milestones, which are as follow:

In the first stage of this work we studied the effect of pH on the inhibitor affinity to BACE-1 and HIV-1, two enzymes of this family that are important therapeutic targets. The protocol used for carrying out these studies involved SPR experiments for determining the inhibitor affinity at several pH values, which were then explained by a the use of molecular calculations aimed at elucidating the underlying causes of the pH effect on affinity. In the case of BACE-1, we chose a set of different BACE-1-inhibitor complexes with known structures whose affinities where studied at pH 4.5 (the optimal pH for the enzyme) and at pH 7.4 (close to the pH at which the crystal structures were obtained). In a first stage we calculated the pK_a values of all titratable residues of the protein by an approximate solution of the Poisson-Boltzmann equation. The results we obtained enabled us to determine the protonation states of these aminoacids at the above mentioned pH values. Perusal of the predicted aspartic dyad protonation states underscores the pK_a dependence on the inhibitor's chemical nature, an outcome that is at variance with previous studies carried out in other labs. The variability of the charge states elicited by our set of inhibitors suggest that it might not be advisable to perform *in silico* HTS

search of fragments or BACE-1 putative ligands with one single protonation state across the board, as done previously by several research groups. More likely, the ligands would have to be classified in accordance with the protonation state they can elicit from the Asp dyad, and then the HTS screening could proceed with several enzyme targets differing in their protonation states.

A similar protocol was applied pH dependence of the inhibitor affinity to HIV-1 PR. For both enzymes studied, the calculation of the charge states of the titratable residues allowed us to predict the binding affinities trends. In general, these calculations reproduce the entire observed affinity ranking upon pH increase and most of the binding trends among inhibitors at low pH values. The agreement between calculated and observed binding ratings lends support to the pK_a assignments provided by the protocol used during our studies.

The short hydrogen bond distances between the inhibitor's OH group and one of the carboxylate oxygens has lead us to postulate the presence of low barrier hydrogen bond (LBHB) between these two atoms, and found that their presence are of the essence in rationalizing the calculated pK_a values for the Asp dyad when bound to some inhibitors and the binding affinities of these ligands.

The second objective of this thesis was the development of a docking protocol for fragment like ligands to BACE-1. Some of the successful approaches for BACE-1 targeted lead drug design have as a starting point the HTS of fragments. The studies described above have found a major role for the active site protonation state of this protein on the inhibitor binding ranking, we designed a docking algorithm that takes into account this feature explicitly and have applied it to set of 23 ligands with a variety of chemical structure motifs that span four orders of magnitude in their binding affinities.

Two of our main specific objectives were to find out the conditions under which the crystallographic poses could be reproduced, and to verify if these conditions allow for an accurate ligand ranking at the optimal pH of the enzyme. These studies enabled us to determine the effect of the ligand's protonation state and the enzyme's ionisable residues on the results. We found out that the biggest influence on the hit rate success is produced by the assignment of a charge state to the inhibitor and the choice of pH value. The enrichment provided by assigning a positive charge to the inhibitor probably is the result of a polar micro-environment created in part by the Asp dyad, which enables the ligand ionisable fragment to keep or increase its pK_a value predicted in solution. In one case we have shown that our calculations have enabled us to predict an approximate pK_a value for the ionisable fragment of the inhibitor, and in some other cases our protocol has allowed us to identify the most likely protonated N atom in charged inhibitors. The highest success rate for finding the observed pose was obtained at neutral pH. This outcome stands to reason since the crystallographic data for BACE-1—inhibitor complexes is obtained at a pH ~ 7. Preliminary results indicate that at the enzyme's optimal pH range (at which all binding assays are carried out) our protocol is able to cluster the experimentally observed best binders at the top of the ranking, and the worst binders at the bottom. It would be desirable to perform the screening campaigns at this range of pH, since the candidate ranking position probably changes with this medium acidity.

We found out that the docking performance results have a strong dependence on the evaluation function used in the re-scoring stage. Some of the best results are obtained using a molecular mechanics interaction energy scoring function within a CHARMM force-field that includes an implicit solvation term. We believe that the use of these kind of functions in pose generation may improve the binding ranking prediction in docking simulations, a very important and unmet aim in this area of research.

The final and most ambitious objective of this thesis was to design candidates that could inhibit some or many of the targets of the amyloid cascade that are supposed to trigger AD. To achieve this goal, we have devised a computer assisted protocol that relies on a pharmacophore whose scaffold was built on knowledge obtained in our lab and others. The search for compounds with the proposed scaffold led us to several families of compounds, including a group of carbazol containing compounds with substituted aniline fragments. This type of compounds have been previously identified as neuro-protecting and neuro-generating compounds in mice. Our work with these had a twofold aim. On one hand, we wanted to investigate if these compounds owed their biologic activity to their binding to some the amyloid cascade targets, and on the other hand, we searched for analogues with an increased affinity for the largest possible set of amyloid cascade targets. The second stage of our computer-assisted protocol, which includes docking studies for the enzymatic targets and molecular dynamic simulations for the study an amyloid peptide fragment's evolution in time in the presence of our candidates, allowed us to fulfill these goals. The main novelty of the docking protocol is that the hit poses should comply with the set of inhibitor-protein interactions assigned to our pharmacophore.

Our predictions suggested that some of the starting compounds only presented affinity for AChE and the Aβ inhibition aggregation, a result that was verified by FRET and ThT binding inhibition assays. In order to improve the binding across all amyloid targets and especially for BACE-1, we proceeded to modify these compounds with the information afforded by two computer aided design cycles. Some of the most promising analogues were synthesized and assayed. The results indicate that some of our third generation compounds bind **to all** amyloid cascade targets (BACE-1, AChE, and amyloid aggregation) leading to truly multi-target compounds. This outcome may usher the systematic search for single molecule multitarget leads for AD, a venue that has been scarcely investigated for the amyloid cascade, given the severe structural differences amongst its targets.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN DE LA TESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1.- LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ALCANCE Y COSTE SOCIAL.

Se estima que la demencia senil afecta a más de 35 millones de personas en el mundo.[1] La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia senil, llegando a suponer un 65% de los casos. Una estimación aproximada indica que las probabilidades de padecer la EA se duplican con cada 5 años de edad a partir de los 60. Como muestra la Figura 1.1, a medida que la media de la población mundial envejece, se espera que el porcentaje de población afectada por la enfermedad aumente, especialmente en los países en vía de desarrollo. Sólo en Europa, se estima que la cantidad de población afectada por la EA supera los 7,4 millones de personas,[1,2] y se proyecta que en veinte años el número total de afectados por la demencia senil alcance los 14 millones.

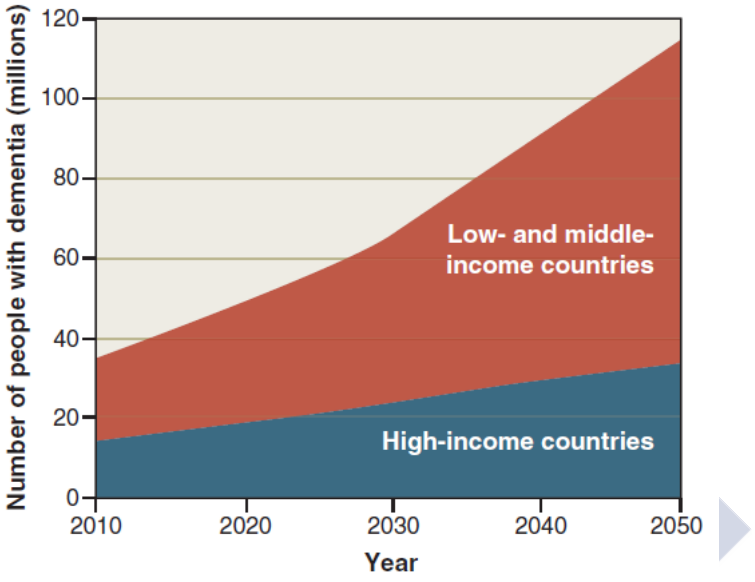


Figura 1.1.- Proyección del incremento de casos de demencia senil en países desarrollados (azul) y en vías de desarrollo (rojo) (Imagen extraída de ref. 1).

Las primeras etapas de la EA, años antes de que sus síntomas se manifiesten de manera visible, consisten en la paulatina destrucción de las conexiones sinápticas en el cerebro. Los síntomas visibles empiezan a manifestarse como incapacidad cognitiva leve (Mild Cognitive Impairment, MCI), con pérdidas leves de memoria. A medida que la enfermedad avanza y el deterioro cerebral empeora, la capacidad cognitiva del individuo se ve progresivamente más dañada, con mayores lapsos de memoria y pérdida de control motor. Finalmente, el daño sináptico acumulado en la masa cerebral causa el colapso sistémico y la muerte del paciente.

Los costes anuales familiares y sociales derivados de la atención a pacientes con EA ascienden, según estimaciones de 2010, a 183 mil millones de euros al año sólo en Europa, lo que supone un 1,1% del producto interior bruto de las naciones en el continente.[1,2] Estos elevados costes (que se proyecta seguirán aumentando en el futuro) se deben a la falta de métodos efectivos

1. A. Wimo, M. Prince. *World Alzheimer Report* **2010**; "The Global Economic Impact of Dementia" (Alzheimer's Disease International, London, 2010)
2. A. Wimo, L. Jönsson, A. Gustavsson, D. McDaid, K. Ersek, J. Georges, L. Gulácsi, K. Karpati, P. Kenigsberg, H. Valtonen. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2011,** *26,* 825–832

para frenar el avance de la enfermedad. Actualmente, no se conocen fármacos capaces de prevenir o frenar la destrucción neuronal; los únicos tratamientos autorizados disponibles presentan una efecto paliativo contra los síntomas de pérdida de memoria.

El inexorable aumento de la población aquejada por la enfermedad de Alzheimer, unido a los elevados costes que supone el cuidado de sus pacientes y a la carencia de tratamientos reales de la misma, han fomentado múltiples estudios en instituciones académicas y por parte de la industria farmacéutica.

1.2.- UNA RETROSPECTIVA SOBRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

En el año 1906, el doctor Alois Alzheimer presentó en un congreso de psiquiatría en Tübingen, al suroeste de Alemania, una exposición titulada "Sobre una peculiar enfermedad grave de la corteza cerebral" ("*Über eine eigenartige erkrankug der hirnrinde*"). En dicha presentación discutió el caso clínico de Auguste D., muerta a los 54 años, cuya combinación de síntomas no pudo asociar a ninguna enfermedad conocida en aquel entonces. La autopsia reveló un cerebro atrofiado, además de alteraciones mayores en los vasos cerebrales. La tinción con plata mediante el método Bielschwsky reveló la presencia de fibrillas teñidas de manera diferente a la de las neurofibrillas estándar, que mostraban una alta coincidencia con el depósito de un producto metabólico patológico en las células gangliales.

A través de toda la corteza cerebral, y especialmente en las capas superiores, se encontraron lesiones de tamaño de semillas pequeñas, caracterizadas por el depósito de una sustancia peculiar. Concluyó sus observaciones indicando que "En conjunto, es obvio que este desorden que, a lo largo de cinco años y medio, ha causado demencia en un adulto de mediana edad, representa una entidad clínico-patológica completamente nueva". Así describió Alois Alzheimer la enfermedad que ahora lleva su nombre, referida como tal por primera vez en 1910 en la octava edición del "Manual de Psiquiatría para Estudiantes y Doctores" de Emil Kraepelin.[3]

La investigación de la enfermedad empezó a despegar durante la segunda mitad del siglo XX, gracias a la aparición de la microscopía electrónica y de nuevos métodos cuantitativos de investigación histoquímicos, histológicos y bioquímicos.[4] La macroestructura de los ovillos neurofibrilares ("Neurofibrilary Tangles", NFT) fue descrita en 1963 por Kidd en el Reino Unido[5] y por Terry en Estados Unidos.[6] Al año siguiente, se identificó el núcleo amiloide de las placas neuríticas.[7] Estos primeros estudios supraestructurales permitieron caracterizar con mayor detalle las proteínas fibrosas anormales y ganar una mejor comprensión de la neurobiología molecular de los mayores marcadores patológicos de la EA. Una serie de investigaciones en el grupo de Sir M. Roth, en Newcastle, abordaron el reto de distinguir cambios entre los cambios patológicos en el cerebro debidos a la EA y aquellos debidos al proceso normal de envejecimiento, comparando los cambios cognitivos en pacientes sanos

3. K. Mauer. *J. Neural Transm.* **2006,** *113,* 1597–1601
4. K. A. Jellinger. *J. Neural Transm*. **2006**, *113,* 1603-1623
5. M. Kidd. *Nature* **1963,** *197,* 192-193
6. R.D. Terry. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **1963,** *22,* 629-642
7. R.D. Terry, N.K. Gonatas, M. *Weiss. Am. J. Pathol.* **1964,** *44,* 269-297

con estimaciones de las lesiones patológicas.[8,9] Estos estudios correlacionaron por primera vez medidas cuantitativas de demencia (incapacidad funcional y cognitiva) con estimados del número de placas y volumen de cerebro destruido, si bien no todos estos estudios pudieron ser confirmados por posteriores análisis estadísticos.[10]

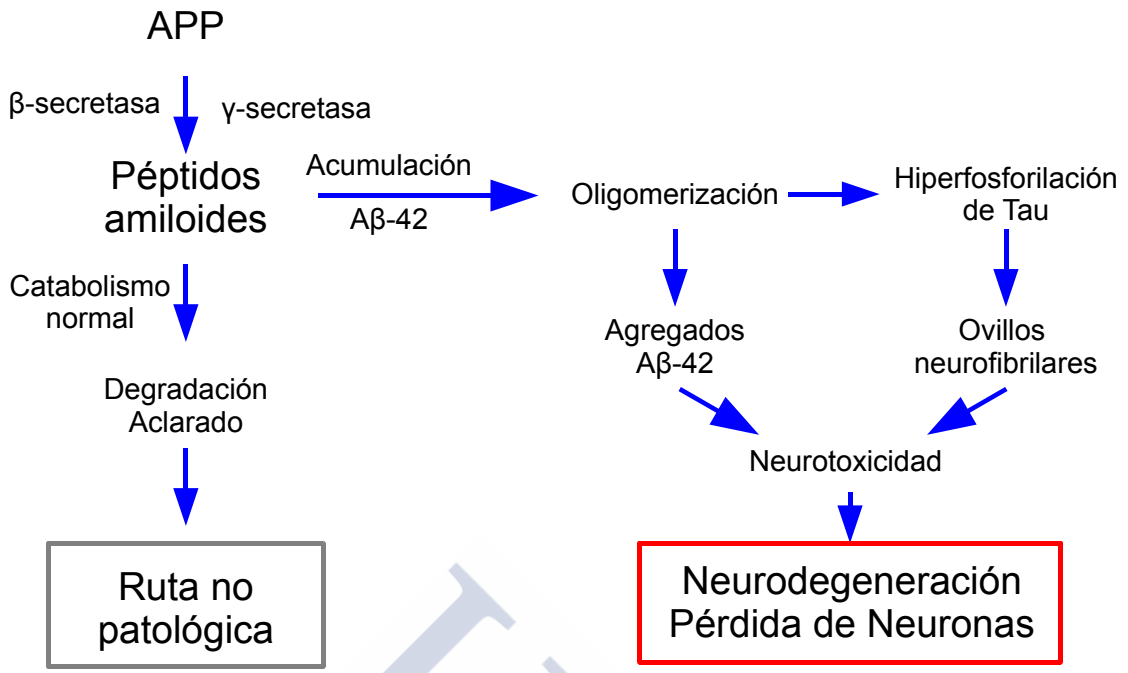
1.3.- CAUSAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Las dos hipótesis principales sobre el origen y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer son la hipótesis Tau y la hipótesis amiloide. Dada la naturaleza sinérgica entre la patología de tipo Tau y la patología de tipo amiloide, la presentación en dos secciones obedece más a un intento por presentar los efectos de cada una de las partes de manera organizada que a una división real entre posibles rutas patológicas de la enfermedad de Alzheimer.

1.3.1.- La hipótesis β-amiloide.

La proteína precursora amiloide (amyloid precursor protein, APP) es una proteína integral de membrana de una familia de proteínas conservadas genéticamente a través de diversas especies, cuya función biológica exacta no ha conseguido esclarecerse todavía.[11] Se trata de una proteína que ha despertado gran atención en el campo de estudio de la enfermedad de Alzheimer, dado su papel en la generación de los fragmentos β-amiloides. Como puede observarse en el Esquema 1.1, que resume el conocimiento actual sobre la etiología de la EA, la APP se ve sometida a un proceso de hidrólisis secuencial por parte de dos aspartilproteasas, la β-secretasa y la γ-secretasa, cuyo resultado es la formación de dichos fragmentos amiloides, de una longitud de 40 o 42 residuos, denominados Aβ-40 y Aβ-42, respectivamente. Como explicaremos a continuación, el péptido Aβ-42 es el que presenta una mayor toxicidad para las neuronas.

8. G. Blessed, B.E. Tomlinson, M. Roth. *Br. J. Psychiatry* **1968,** *114,* 797-811
9. B.E. Tomlinson, G. Blessed, M. Roth. *J. Neurol. Sci.* **1970,** *11*, 205-242
10. R.D. Terry, E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, R. Katzman. *Ann. Neurol.* **1991**, *30*, 572-580
11. K.T. Jacobsen, K. Iverfeldt. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66,* 2299-2318



Esquema 1.1.- Ruta patológica de la EA.

La hipótesis del origen amiloide de la EA, elaborada por Selkoe en 1991[12] y por Hardy y Higgins en 1992,[13] propone que la etapa crucial de la enfermedad es la agregación de los péptidos amiloides en especies oligoméricas y finalmente en fibrillas, también referidas como placas. La hipótesis actual[14] indica que las placas amiloides actúan como repositorio de oligómeros del péptido β-amiloide de 42 residuos (Aβ-42), la especie que se considera más nociva para las conexiones sinápticas entre neuronas. La Figura 1.2 describe el origen del efecto tóxico de los agregados amiloides en las neuronas. Como se puede ver en esta figura, los oligómeros del péptido Aβ tienden a interrumpir las conexiones sinápticas, mientras que las fibrillas tienden a evitar la orientación correcta de las neuronas. Estos procesos causan la muerte neuronal desencadenante de toda la sintomatología asociada a la EA. Esto ha podido probarse para el caso de la EA temprana (también conocida como familiar, dado su componente genético), gracias a diversos ensayos con animales transgénicos y estudios de marcadores. Todavía no está completamente demostrado que esto sea cierto para los casos de la EA esporádica tardía (más habituales que los casos familiares), si bien la mayoría de información disponible parece apoyar el caso. [4]

12. D.J. Selkoe. *Neuron* **1991**, *6,* 487-498
13. JA. Hardy, GA Higgings. *Science* **1992,** *25,* 184-185
14. D.J. Selkoe. *Nature Med.***2011,** *17,* 1060-1065

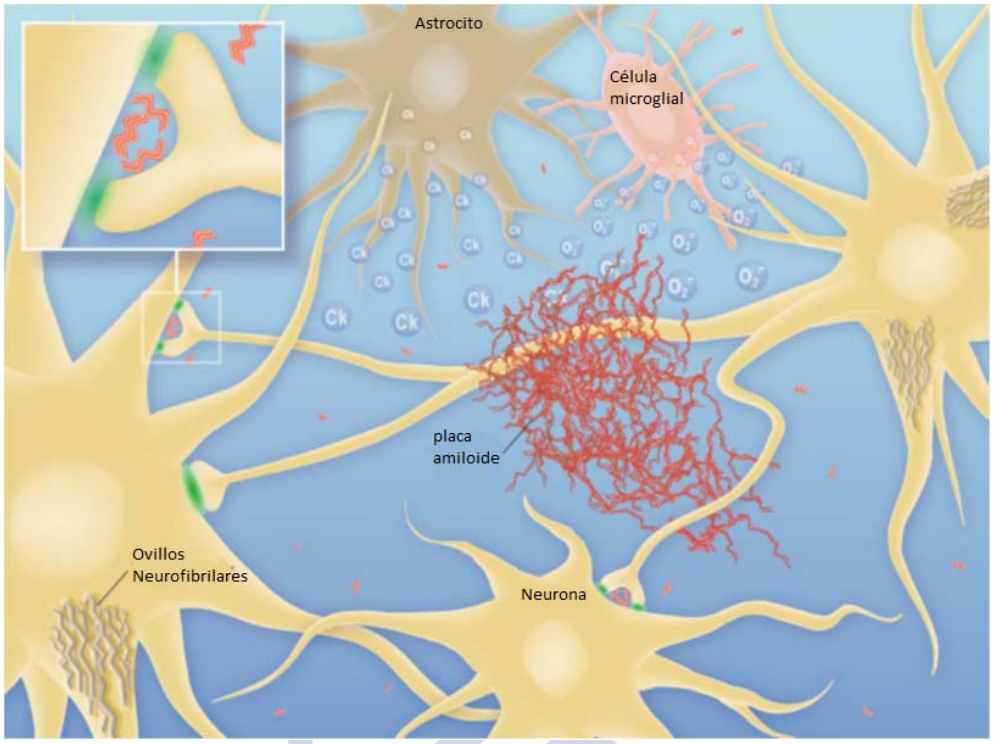


Figura 1.2.- Efectos patogénicos de los agregados Aβ y las fibrillas (o placas) amiloides (Imagen extraída de ref. 15).

1.3.2.- La hipótesis Tau.

La proteína Tau es una fosfoproteína promotora de la formación y estabilización de los microtúbulos, una parte del citoesqueleto neuronal que permite el transporte de vesículas y orgánulos (Figura 1.3), en la cual el grado de fosforilación cumple un papel regulador de la actividad de dicha proteína.[16] Cuando la proteína Tau se encuentra anormalmente hiperfosforilada pierde su efectividad y resulta en la formación de los ovillos neurofibrilares (Neurofibrilar tangles, NFT) detectados en el cerebro de los pacientes con EA.[16] Se ha demostrado que la fosforilación anormal de la proteína Tau está relacionada con múltiples enfermedades esporádicas neurodegenerativas, entre las que se incluye la EA.

La Figura 1.4 muestra como una proteína Tau con un grado de fosforilación normal, la que se encuentra en muestras de tejido cerebral sano, no sobrepasa un total de dos o tres residuos fosforilados. El número de residuos fosforilados llega a nueve por proteína en una muestra de tejido cerebral aquejado de la enfermedad de Alzheimer. Como muestra dicha figura, la hiperfosforilación de Tau lleva a su vez a la formación de oligómeros, que se agregan en fibrillas Tau, los núcleos de los ovillos neurofibrilares. No existe un residuo específico cuya fosforilación resulte responsable de la neurotoxicidad de Tau; es la fosforilación excesiva de residuos la que causa este proceso.

15. D.M. Walsh, D.J. Selkoe. *Neuron* **2004**, *44*, 181-193
16. M. Obulesu, R. Venu, R. Somashekhar. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 1329-1335

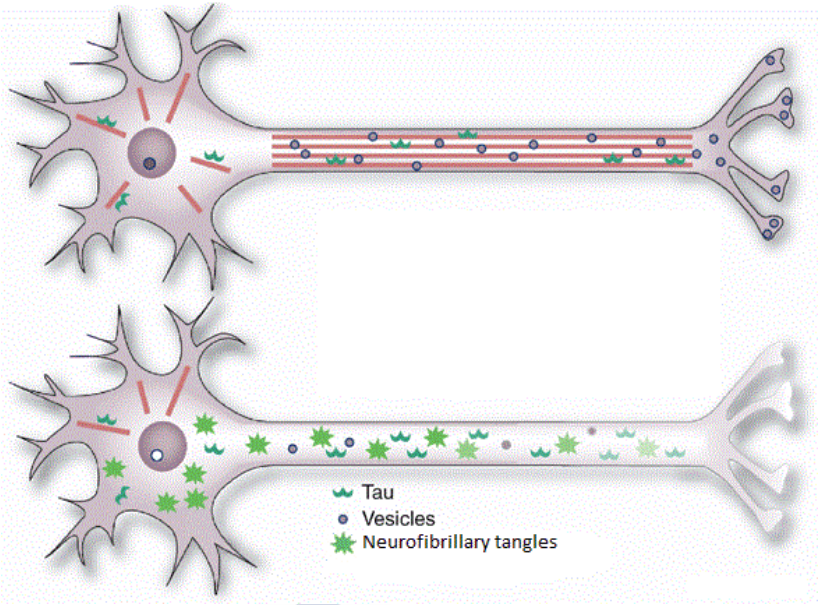


Figura 1.3.- *Imagen superior* Una neurona no afectada por la formación de ovillos neurofibrilares. *Imagen inferior* Una neurona afectada por la formación de ovillos neurofibrilares (Imagen extraída de ref. 17).

Como muestra el Esquema 1.1, actualmente se considera que la acumulación de Tau hiperfosforilada forma una etapa posterior en la cascada degenerativa β-amiloide, donde una primera interrupción sináptica debido al desequilibrio entre generación y eliminación de β-amiloide produce a su vez un exceso de fosforilación de proteínas Tau. La hiperfosforilación de Tau resulta en la formación de los ovillos neurofibrilares, que aceleran el proceso de extinción neuronal en el cerebro afectado por la EA. Como puede observarse en la Figura 1.3, la formación de los ovillos Tau - debida a la fosforilación excesiva de la proteína Tau - destruye los microtúbulos (ilustrados en rojo) esenciales para la integridad física de las neuronas.

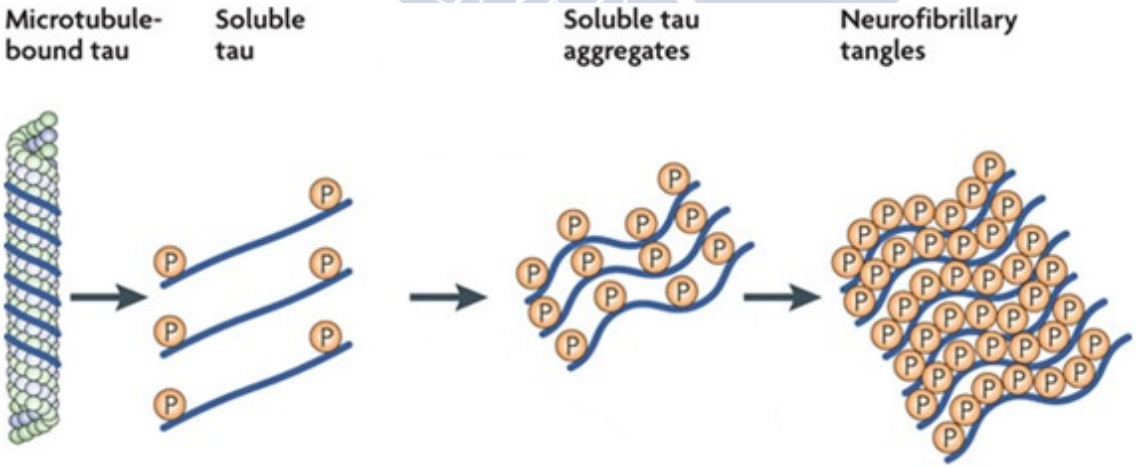


Figura 1.4.- Esquema de la sobrefosforilación y agregación de Tau (Imagen extraída de ref. 18).

17. J.Q. Trojanowski, V.M-Y Lee. *Nature Neurosci.* **2005,** *8*, 1136-1137
18. M. Citron. *Nature Rev. Drug Disc.* **2010**, *9,* 387-398

1.4.- TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.

1.4.1.- La terapia colinérgica.

La degeneración de las funciones cognitivas durante el desarrollo de la EA se ha asociado a la reducción de los niveles de acetilcolina (ACh) en las regiones del cerebro encargadas del aprendizaje, memoria, comportamiento y respuesta emocional, debido a la pérdida de neuronas colinérgicas basales de la parte anterior del cerebro.[19] La observación de efectos adversos de los fármacos anticolinérgicos así como el bajo nivel de ACh observado en el análisis post-mortem de cerebros de pacientes de EA, sugieren que un aumento del nivel de acetilcolina podría paliar los efectos nocivos para las funciones cognitivas que derivan de la enfermedad. Estas ideas han dado lugar al tratamiento colinérgico basado en el incremento de los niveles sinápticos de acetilcolina mediante la inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa, la principal enzima responsable de la hidrólisis de acetilcolina. Se han empleado inhibidores como la galantamina, donepezilo, rivastigmina o tacrina, ilustrados en la Figura 1.5, en el tratamiento clínico paliativo, el único que se conoce por el momento para la EA. [20]

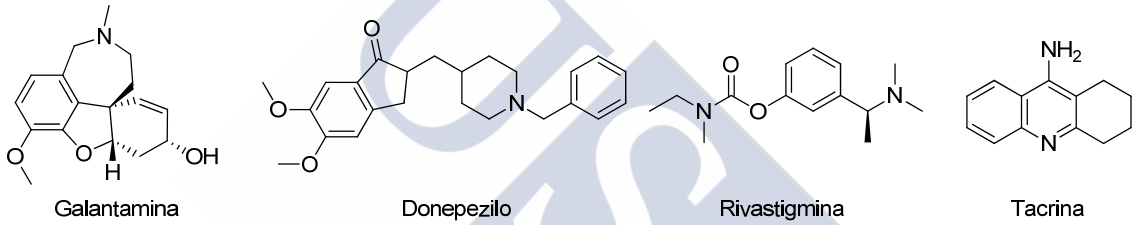


Figura 1.5.- Estructuras de fármacos para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer.

1.4.2.- Otras terapias: Fármacos en pruebas clínicas. Prevención.

Ha habido un esfuerzo ingente, por parte tanto de instituciones académicas como de la industria farmacéutica, destinado a encontrar terapias curativas para la EA. Una cantidad importante de los candidatos a fármacos no han sobrepasado la fase 1 de los estudios clínicos, debido a su toxicidad, mientras otros no han sobrepasado la fase 3, debido a su falta de efectividad.[20,21] Un resumen de los múltiples estudios llevados a cabo se puede ver en la Figura 1.6, donde se aprecia como los fármacos incluidos en la Figura 1.5 han sido comercializados como tratamiento. Uno de los factores que más puede influenciar los fallos en las etapas tardías es que los síntomas externos se manifiestan cuando los daños en la masa encefálica se encuentran ya muy avanzados. Una posible manera de evitar este problema es llevar a cabo los ensayos de candidatos a fármacos de la EA en aquellos pacientes con predisposición genética a manifestar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas. [21] Además, durante los últimos años ha habido avances muy significativos en el descubrimiento de biomarcadores que permitan el diagnóstico precoz de la EA, antes de la aparición de los síntomas característicos más visibles, con el fin de poder aplicar los fármacos en estados tempranos de la enfermedad.[21]

19. P. Anand, B. Singh, N. Singh. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20,* 1175-1180
20. F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, M. Kivipelto. *Lancet. Neurol.* **2010**, *9*, 702-716
21. G. Miller. *Science.* **2012**, *337*, 790-792

A la hora de diseñar fármacos contra la EA, las estrategias farmacológicas dependerán de los distintos objetivos perseguidos. Así, según las hipótesis expuestas, la investigación se puede centrar en la terapia β-amiloide, mediante la inhibición de síntesis de péptidos β-amiloides, la prevención de formación de agregados y/o el incremento de la eliminación de péptidos β-amiloides del entorno; o bien en la terapia Tau, donde los objetivos se centraran en la inhibición de la hiperfosforilación de Tau o la prevención de formación de ovillos neurofibrilares. Sea cual sea la estrategia, el objetivo principal en el desarrollo de terapias preventivas[20] se centra en evitar la formación de agregados proteicos.

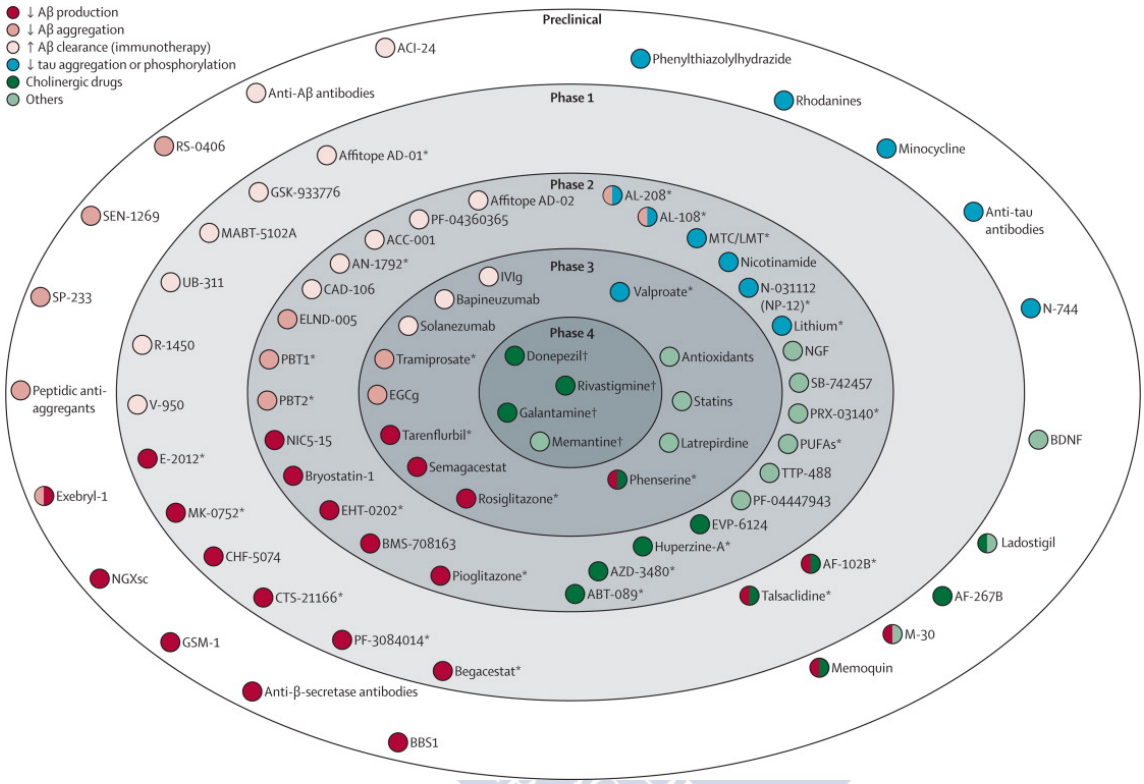


Figura 1.6.- Esquema con diversos fármacos y la etapa clínica en la que se encontraban en 2010. Un asterisco marca estudios descontinuados; una cruz marca medicamentos comercializados (Figura extraída de ref. 20).

Otras estrategias, no comentadas anteriormente, se basan en el tratamiento de la disfunción mitocondrial y en la neurogénesis como nuevas posibles rutas que buscan tratamientos más generales que los centrados en dianas proteicas.

La disfunción mitocondrial ocurre en las fases tempranas de la EA, y puede promover daños sinápticos y apoptosis, por lo que se cree que tiene un papel causal en la neurodegeneración. Tanto APP como Aβ pueden entrar en la mitocondria, impedir la producción de ATP, e incrementar daños oxidativos.[20]

Por otra parte, la neurogénesis, o crecimiento de nuevas neuronas, puede ocurrir en el cerebro adulto en respuesta a daños. La supervivencia y formación de fibras de las neuronas colinérgicas basales en la parte frontal del cerebro (donde actúa la terapia paliativa colinérgica) depende de los factores de crecimiento neuronal (Neural Growth Factor, NGF). Investigaciones recientes sugieren un enlace causal entre desequilibrios de NGF, la activación de la cascada β-amiloide, y la neurodegeneración característica de la EA. Así, se han estudiado

diversas rutas para la estimulación de la neurogénesis, ya sea mediante inyección dirigida de NGF a la zona basal frontal del cerebro, mediante biodistribución de NGF encapsulada en celdas, o mediante distribución intranasal o en la superficie ocular de NGF, con objeto de fomentar el crecimiento de nuevas neuronas colinérgicas basales en la parte anterior del cerebro y así reparar los daños causados por la EA. Sin embargo, hasta ahora ninguno de estos métodos ha superado la fase 3 de los ensayos clínicos.[20]

Además de los métodos descritos, se han abordado otras estrategias terapéuticas potenciales: estudios con ácidos grasos poli-insaturados de tipo Ω-3, estatinas, fármacos serotoninérgicos, regulación de la fosfodiesterasa 9A o regulación del receptor de productos finales de la glicación avanzada (Receptor for Advanced Glycation Endproducts, RAGE). Algunos de estos estudios se encuentran todavía en las etapas tempranas de investigación, y en otros casos los resultados de los experimentos han resultado ser contradictorios o negativos.[20]

1.5.- DIANAS FARMACOLÓGICAS DE LA CASCADA β-AMILOIDE.

La β-secretasa es una de las dianas principales en la formación de péptidos amiloides, por su papel en la hidrólisis de APP. Muchos investigadores se han centrado en la inhibición de la agregación de estos péptidos amiloides resultantes de dicha hidrólisis. También hay otras dianas que tienen un papel en la agregación de Aβ-42 en oligómeros y fibrillas, como AChE. Esta enzima, al igual que BuChE en menor medida, es además un objetivo fundamental en los tratamientos paliativos actuales. Por último, a efectos de disponer de una visión global de las opciones disponibles, se mecionarán brevemente algunas de las dianas que no son objeto de estudio en esta tesis, como la α- y la γ-secretasa.

1.5.1.- Enzima β-secretasa.

La β-secretasa, también llamada memapsin-2 o BACE-1, es una proteína de tipo aspartilproteasa anclada en la membrana celular, que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la formación de péptidos β-amiloides. Esta primera etapa de hidrólisis de la APP produce dos fragmentos, de los cuales el anclado a la membrana es después hidrolizado de nuevo por la γ-secretasa para generar los péptidos β-amiloides (ver Figura 1.7). Dado el papel central de BACE-1 (como referiremos a esta enzima a lo largo de la tesis) en la etiología de la EA,[22] descrito en el Apartado 1.3, esta enzima se ha transformado en un objetivo terapéutico prioritario para el tratamiento de esta enfermedad.

Se han realizado numerosos estudios estructurales de Rayos X del complejo formado por el dominio catalítico de esta enzima, compuesto de 385 aminoácidos, con una gran variedad de inhibidores.[23,24] La primera estructura cristalográfica de un complejo proteína-inhibidor para

22. R. Vassar, B.D. Bennett, S.Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendíaz, P. Dennis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J-C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron. *Science* **1999**, *286*, 735-741
23. M.C. Villaverde, L. González-Louro, F. Sussman. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 980-990
24. J. Yuan, S. Venkatraman, Y. Zheng, B.M. McKeever, L.W. Dillard, S.B. Singh. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4156-4180

BACE-1 fue obtenida en el laboratorio de J.Tang, en el año 2000.[25] La Figura 1.8 muestra la estructura del inhibidor de este complejo, OM99-2, y - en magenta - su posición en el sitio activo de esta enzima en el complejo (PDB id. 1FKN).

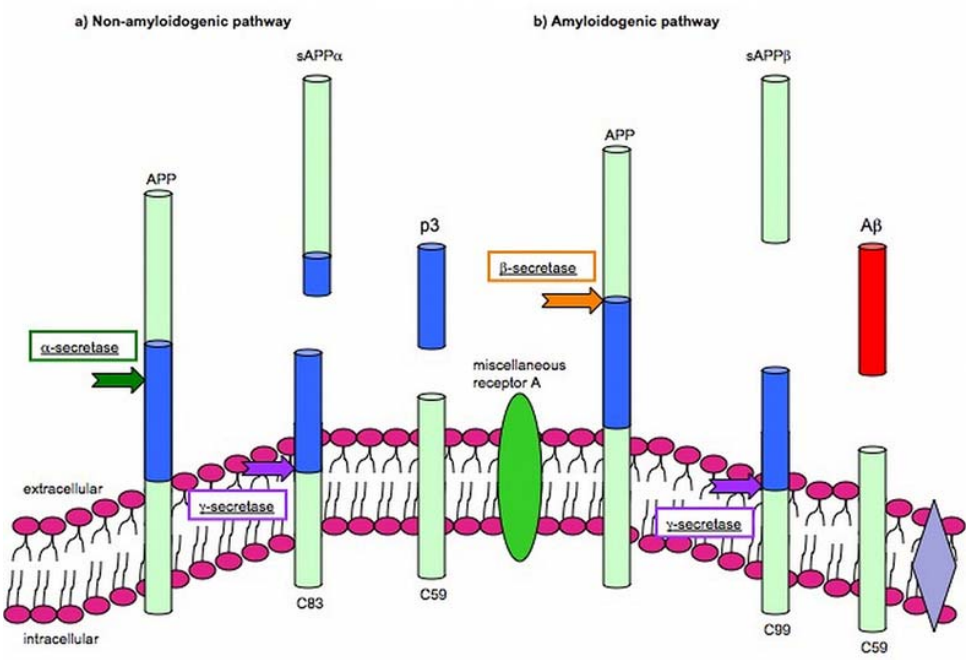


Figura 1.7. Posibles rutas de hidrólisis de la APP (Imagen extraída de ref. 26).

El análisis de las estructuras como la de la Figura 1.8 indica que, a diferencia de muchas otras aspartilproteasas, el sitio activo de BACE-1 presenta un elevado grado de exposición al disolvente. Se ha observado en las estructuras con los inhibidores peptídicos que éstos se encuentran aislados del disolvente únicamente por una horquilla β formada por siete residuos (Val69 a Lys75), conocida como "*flap*". Esta estructura posee notable flexibilidad, cerrándose sobre el sustrato durante el proceso de hidrólisis de la APP. La alta plasticidad del sitio activo de esta enzima supone uno de los principales desafíos para el diseño de inhibidores potentes de BACE-1. Los primeros inhibidores que se estudiaron eran análogos del estado de transición del proceso catalítico y eran altamente peptídicos,[23] como es el caso del inhibidor OM99-2 presentado en la Figura 1.8. Investigaciones posteriores demostraron la existencia de ligandos que se unen al *flap* y lo mantienen abierto, evitando así la acomodación del sustrato y por lo tanto inhibiendo el proceso catalítico. Esta figura muestra dos posibles posiciones del *flap*, influenciadas por la presencia de dos tipos distintos de inhibidor. También se puede observar como inhibidores peptídicos tales como OM99-2 (resaltado en magenta), se disponen en la misma orientación que el sustrato, lo que permite el cierre del *flap,* mientras que inhibidores no peptídicos, como el resaltado en amarillo, se encuentran en una disposición perpendicular a la que adoptaría el sustrato, manteniendo así el *flap* abierto.[27]

25. L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, J. Tang. *Science* **2000**, *290,* 150-153
26. V. Mbazima, B. da Costa Días, A. Omar, K. Jovanovic, S. F. Weiss. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 1150-1163
27. S.J. Stachel, C.A. Coburn, T.G. Steele, K.G. Jones, E.F. Loutzenhiser, A.R. Gregro, H.A. Rajapakse, M.T. Lai, M.C. Crouthamel, M. Xu, K. Tugusheva, J.E. Lineberger, B.L. Pietrak, A.S. Espeseth, X.P. Shi, E. Chen-Dodson, M.K. Holloway, S. Munshi, A.J. Simon, L. Kuo, J.P. Vacca. *J. Med. Chem.* **2004,** *47,* 6447-9450

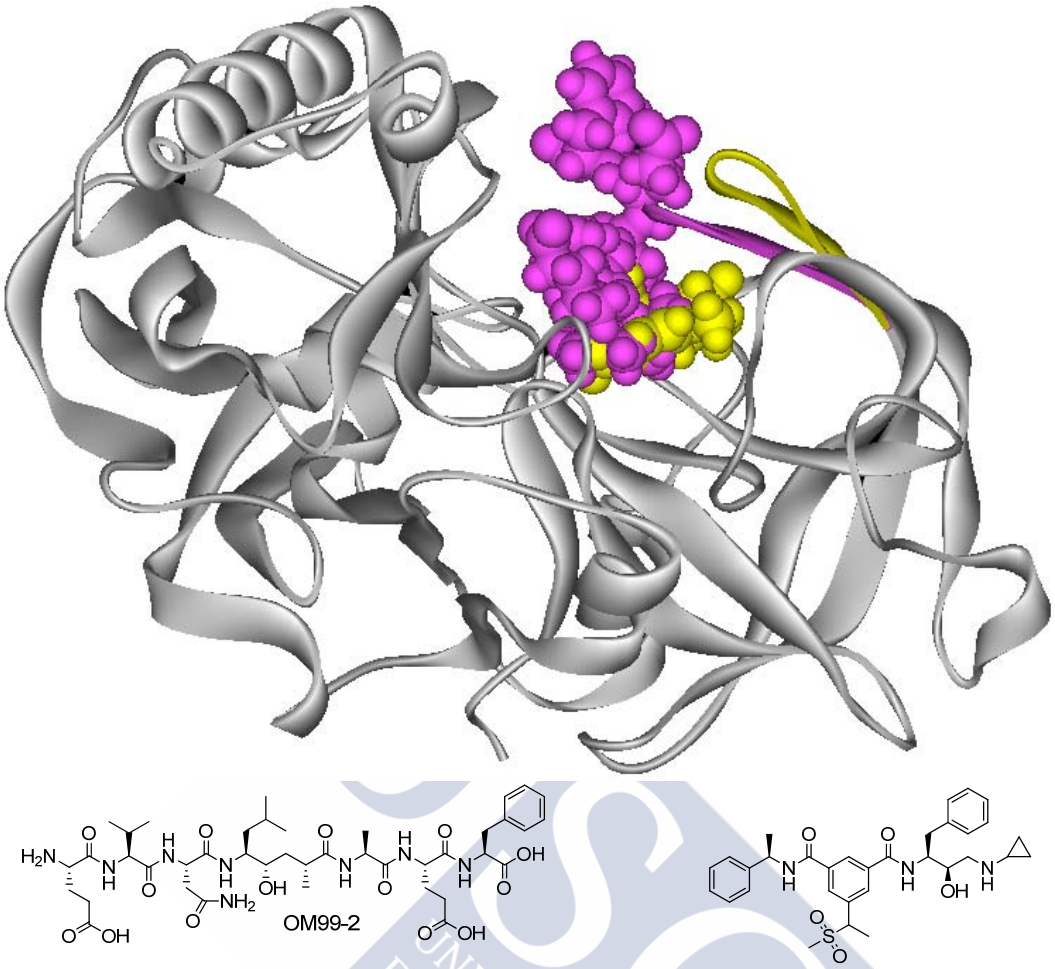
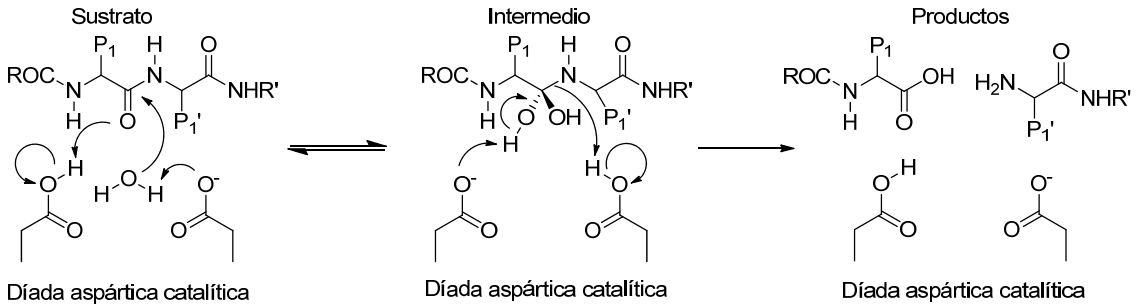


Figura 1.8.- Superimposición de las estructuras de BACE-1 unida a un inhibidor peptídico (OM99-2, PDB id. 1FKN, *flap* e inhibidor en magenta) y a un inhibidor no peptídico (PDB id. 2B8L, *flap* e inhibidor en amarillo), y estructuras de los inhibidores.

La maquinaria catalítica de la familia de aspartilproteasas, de la cual BACE-1 forma parte, está formada por dos residuos de ácido aspártico (Asp 32 y Asp 228 en el caso de BACE-1) próximos entre sí, que forman la llamada díada catalítica. La estructura de la enzima libre de ligandos muestra una molécula de agua unida por enlaces de hidrógeno a la díada aspártica, que está también íntimamente involucrada en la catálisis hidrolítica.[28] El Esquema 1.2 muestra el mecanismo catalítico que emplea BACE-1 según una de las hipótesis más aceptadas e ilustra el papel de estos residuos ácidos y la molécula de agua en dicho proceso. Estos dos residuos son también el punto de interacción más obvio a la hora de establecer enlaces de hidrógeno y electrostáticos con los candidatos a inhibidor, con lo que la interacción con esta díada catalítica es uno de los principales factores que guían el diseño de los candidatos a inhibidores de BACE-1.

28. D.B. Northrop. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34,* 790-797



Esquema 1.2.- Representación esquemática simplificada del ciclo catalítico de BACE-1.

BACE-1 es una proteína de transmembrana, generalmente localizada en la superficie celular donde el pH del entorno es neutro. Para llevar a cabo su actividad catalítica, la proteína y su sustrato son cotransportados a las vesículas endosomales, donde el pH es óptimo (4.5-5.5) para la catálisis. La Figura 1.9 muestra una descripción esquemática de este proceso.[29]

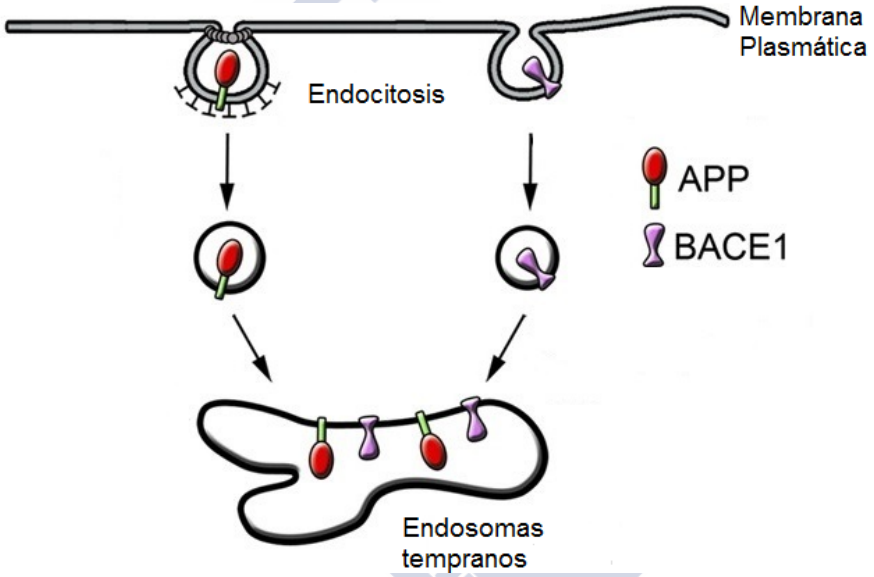


Figura 1.9.- Ilustración esquemática del movimiento de BACE-1 de la superficie a los endosomas (Imagen extraída de ref. 29).

Como hemos mencionado anteriormente, las primeras generaciones de inhibidores eran de origen peptidomimético, de 8 a 12 residuos de largo,[23] con isósteros de γ– o δ-aminoácidos, que incluyen un grupo hidroxilo y/o amino como puntos de anclaje a la díada aspártica. La Figura 1.10 muestra una colección de algunos de los isósteros empleados en el diseño de inhibidores. En general, se puede encontrar bastante diversidad funcional en los modelos de unión con la díada catalítica de BACE-1.[30,31]

Sin embargo, el elevado peso molecular de los inhibidores peptídicos supone un grave impedimento a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica. Además, esta clase de

29. R. Sannerud, I. Declerck, A. Peric, T. Raemaekers, G. Menéndez, L. Zhou, B. Veerle, K. Coen, S. Munck, B. De Strooper, G. Schiavo, W. Annaert. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13893-13894
30. C.I. Stains, K. Mondal, I. Ghosh. *ChemMedChem.* **2007**, *2*, 1674-1692
31. J.S. Albert. *Prog. Med. Chem.* **2009**, *48,* 133-161

compuestos son suscetiples a hidrólisis durante la administración por vía oral, y presentan un elevado número de funciones dadoras y aceptoras de enlace de hidrógeno. El conjunto de estos factores resulta en candidatos a fármaco de baja biodisponibilidad, por lo que se se inició la búsqueda de nuevas alternativas que no presenten estas desventajas.

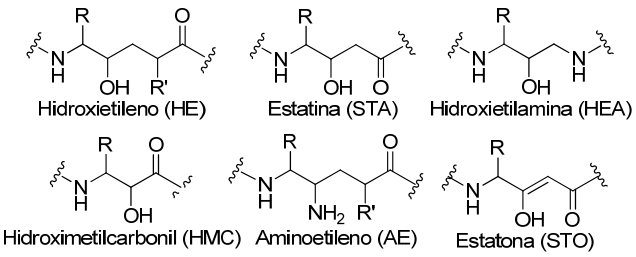


Figura 1.10.- Algunos ejemplos de isósteros de inhibidores peptídicos de BACE-1.

Los estudios sobre moléculas pequeñas (de un peso molecular no superior a los 250 Da) han sido de particular relevancia en la búsqueda de candidatos a inhibidor de BACE-1 no peptídicos de segunda generación.[32] Este tipo de compuestos presentan ciertas ventajas sobre otros compuestos de mayor tamaño, más similares a fármacos: las colecciones de compuestos a estudiar son más reducidas, debido a la simplicidad estructural de los componentes. Esta simplicidad disminuye el número de variables estructurales, lo que reduce el total de candidatos; esto supone un incremento en la eficiencia de los estudios. Su naturaleza modular también permite examinar nuevas variantes de grupos de anclaje con la diada. Además, a pesar de presentar resultados bajos de inhibición, la reducida masa molecular de los fragmentos resulta en una elevada eficiencia de ligando. Por último, los fragmentos pueden actuar como cabezas de serie a los que aplicar modificaciones estructurales, mostrándose más maleables que estructuras más complejas a la hora de alterar su funcionalidad para aumentar su efectividad.[24,32]

1.5.2.- Agregados β-amiloides.

Como se ha indicado durante la explicación de la hipótesis amiloide, actualmente se acepta que los agregados oligoméricos de péptidos Aβ-42 son la especie más nociva para las conexiones sinápticas. En una fase inicial, los monómeros Aβ-42 se agregan[33] formando oligómeros que a su vez se acoplan en las fibrillas,[34] adoptando una disposición de láminas-β. Estas láminas-β se pliegan en forma de horquilla (Figura 1.11).

Muchos autores han buscado por tanto inhibir el proceso de agregación de péptidos amiloides, ya que dicho proceso en sí mismo podría constituir una diana terapéutica para la EA. Para ello, se han buscado compuestos capaces de interrumpir los contactos clave en la agregación de Aβ-42 en oligómeros y fibrillas.[35]

32. C.W. Murray, O. Callaghan, G. Chessari, A: Cleasby, M. Congreve, M. Frederikson, M.J. Hartshorn, R. McMenamin, S. Patel, N. Wallis. *J. Med. Chem.* **2007**, *50,* 1116-1123
33. O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A.M. D'Ursi, P.A. Temussi, D. Picone. *Eur. J. Biochem.* **2002,** *269*, 5642-5648
34. T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, R. Riek. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005,** *102,* 17342-17347
35. M. Convertino, A. Vitalis, A. Caflisch. *J. Biol. Chem.* **2011**, *155*, 13065-13074

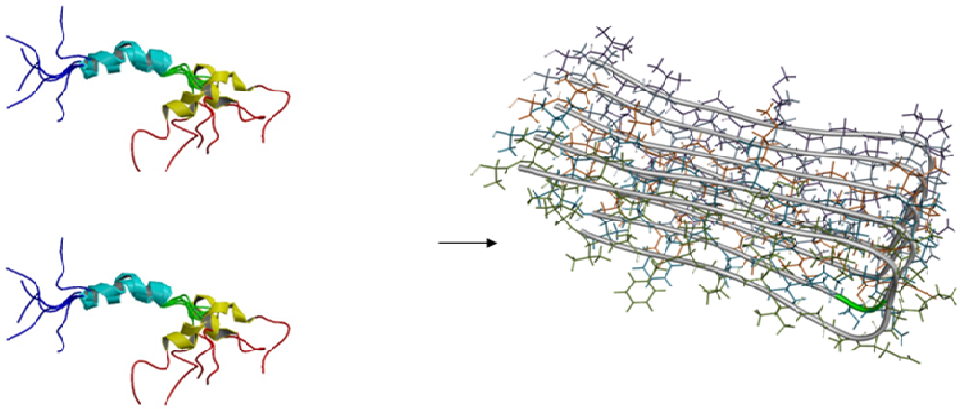


Figura 1.11.- Acoplamiento de péptidos Aβ-42 (PDB id. 1Z0Q) en fibrillas (PDB id. 2BEG).

Uno de los principales desafíos a la hora de diseñar fármacos capaces de impedir la formación de agregados β-amiloides, proviene de la naturaleza del objetivo. No se trata de buscar un fármaco capaz de interactuar con un sitio activo definido de una proteína, para inhibir un proceso catalítico, sino que la asociación podría producirse con varios segmentos de la cadena peptídica esenciales para la formación de agregados amiloides. Aún así, en la bibliografía se pueden hallar ejemplos de moléculas pequeñas, como derivados de estirilbenceno, ácido ferúlico, resveratrol o curcumina (Figura 1.12), capaces de enlazarse con los péptidos Aβ-42 e inhibir la formación de agregados y/o fibrillas.[36]

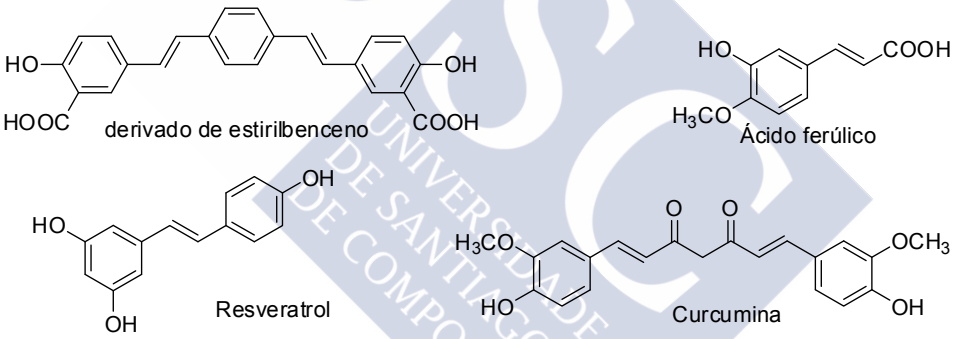


Figura 1.12.- Ejemplos de inhibidores de la agregación de Aβ-42.

A diferencia de lo que sucede con BACE-1, las escasas estructuras cristalográficas disponibles[37] del complejo del agregado amiloide con un ligando acoplado no permiten extrapolar una relación estructura-actividad para el desarrollo de nuevas generaciones de inhibidores. Entre las herramientas que han permitido visualizar en detalle las posibles interacciones del ligando con los agregados se encuentran las simulaciones de dinámica molecular (DM) de larga duración. La Figura 1.13 muestra algunas instantáneas de las trayectorias de DM llevadas a cabo en el grupo de A. Caflisch[38] para ligandos como la 9,10-antraquinona unidos a tres cadenas compuestas por los residuos 14-20 del péptido Aβ-42. Como puede observarse, la 9,10-antraquinona se intercala en la estructura trimérica, interrumpiendo los contactos de enlace de hidrógeno que estabilizan la formación de dicho trímero.

36. Y. S. Lee, H. Y. Kim, Y.S. Kim, J. H. Seo, E. J. Roh, H. Han, K. J. Shin. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20,* 4921-4935
37. T. Richard, Y. Papastamoulis, P. Waffo-Teguo, J.P. Monti. *Biochim. Byophis. Acta* **2013**, *1830*, 5068-5074
38. M. Convertino, R. Pellarin. M. Catto, A. Carotti, A. Caflisch. *Protein Sci.* **2009,** *18*, 792-800

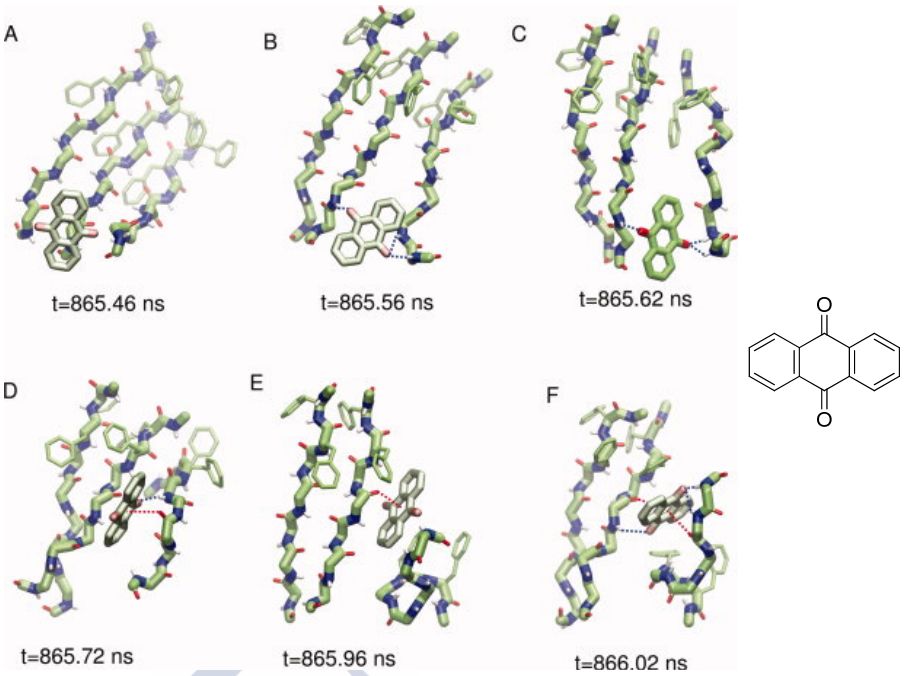


Figura 1.13.- Representación de las coordenadas de la trayectoria de DM de inhibición de la agregación de un trímero de Aβ-42 (residuos 14 a 20) por parte de la 9,10-antraquinona (ilustrada en la derecha) (Imagen extraída de ref. 38).

Este tipo de herramientas computacionales desempeñan un papel fundamental en la búsqueda de cabezas de serie para la inhibición de la agregación de Aβ-42, similar al que las distintas herramientas de acoplamiento cumplen en el desarrollo de nuevos fármacos para otras dianas proteicas.

1.5.3.- Enzima acetilcolinesterasa.

La acetilcolinesterasa, o AChE, es una enzima de 543 residuos que pertenece a la familia de las hidrolasas de serina, responsable de la terminación de transmisiones sinápticas mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh). La primera estructura cristalográfica de la acetilcolinesterasa se obtuvo en 1993, perteneciente a la especie *Torpedo californica*.[39] El elevado grado de homología entre esta proteína y la variante humana permiten realizar los estudios sobre la primera, y será la estructura y numeración de AChE extraída de la *Torpedo californica* la que se emplee a lo largo de los estudios computacionales de esta tesis.

La Figura 1.14 describe esquemáticamente los sitios de enlace en AChE. La principal actividad catalítica se lleva a cabo en un sitio esteárico, donde la tríada de residuos catalíticos Ser200, His440 y Glu327 lleva a cabo la hidrólisis de ACh. Además, se observa un sitio aniónico catalítico (Catalytic Anionic Subsite, CAS) cercano a la localización del sitio esteárico, compuesto por los residuos Trp84, Glu 199 y Phe330 encargado de enlazar con el amonio cuaternario del sustrato. A pesar del nivel de internalización de su sitio activo, la velocidad a la

39. M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P.H. Axelsen, I. Silman, J.L. Sussman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90,* 9031-9035

que AChE cataliza la reacción es próxima a la velocidad de una reacción controlada por difusión de sustratos en el medio.[40]

Como puede observarse en la Figura 1.14, se puede acceder al sitio activo donde se lleva a cabo el proceso catalítico mediante un canal de aproximadamente 15 Å de largo, cuyas paredes están cubiertas por hasta 14 residuos aromáticos. En la entrada de este canal, que comunica el sitio activo con el entorno, se encuentra el sito aniónico periférico (Peripheral Anionic Site, PAS), que también presenta diversos residuos arómaticos (Tyr70 y Trp279, entre otros). La elevada densidad de grupos aromáticos presente tanto en el canal como en estos sitios se ha aprovechado con éxito en el diseño de inhibidores de AChE. Tanto en el sitio catalítico como en el periférico se pueden encontrar residuos aromáticos que pueden adoptar una disposición paralela entre sí, permitiendo que se establezcan interacciones de apilamiento-π con inhibidores que posean grupos aromáticos.

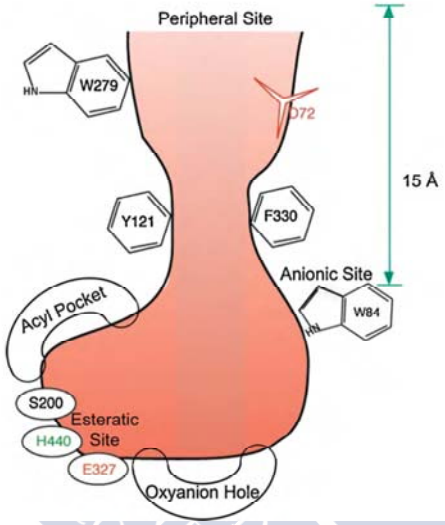


Figura 1.14. Ilustración esquemática del sitio activo activo de AChE y acceso desde el sitio periférico (Imagen extraída de ref. 41).

Además, se ha demostrado que el PAS de AChE, en la entrada del canal que conduce al sitio activo, puede promover la agregación de los péptidos β-amiloides que conduce a fibrillas, lo que facilita la formación de los repositorios de oligómeros nocivos de Aβ-42 mencionados con anterioridad.[41,42] Por lo tanto, otra posible ruta de aproximación para el tratamiento de la EA incluiría el diseño de un fármaco capaz de reducir esta actividad promotora de la agregación que ejerce la región periférica de AChE.

La conexión mediante el canal de la región aniónica periférica y la región aniónica catalítica del sitio activo de AChE permite una nueva aproximación a la inhibición de esta enzima. Específicamente, se trata de buscar ligandos formados por dos fragmentos capaces de unirse al CAS y al PAS respectivamente, separados por un espaciador de la longitud adecuada para permitir un enlace dual. Un candidato a fármaco basado en esta premisa presentaría un efecto sinérgico en el tratamiento de la EA. Se han desarrollado compuestos con estas características,

40. Y.Zhou, S. Wang, Y. Zhang. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8817-8825
41. H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman. *Chem-Biol. Inter.* **2010**, *187,* 10-22
42. N.C. Inestrosa, A. Álvarez, C.A. Pérez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C. Soto, J. Garrido. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891

tales como la *bis*-tacrina y sus derivados; la interacción de uno de estos derivados con los sitios aniónicos catalítico y periférico se ilustran en la Figura 1.15.[43] Como se muestra en dicha figura, la principal interacción entre el inhibidor y los sitios aniónicos catalítico y periférico (CAS y PAS) es de tipo apilamiento-π: los grupos aromáticos en los extremos del inhibidor establecen una interacción de tipo cara a cara con dos residuos aromáticos clave en cada sitio de unión.

El doble papel que juega AChE en la cascada patológica de la EA convierte a dicha enzima en un posible objetivo terapéutico para el tratamiento de la enfermedad, ya que su inhibición no sólo ralentizaría la destrucción del neurotransmisor acetilcolina, sino que también ralentizaría el proceso de agregación de los monómeros de Aβ-42.[44]

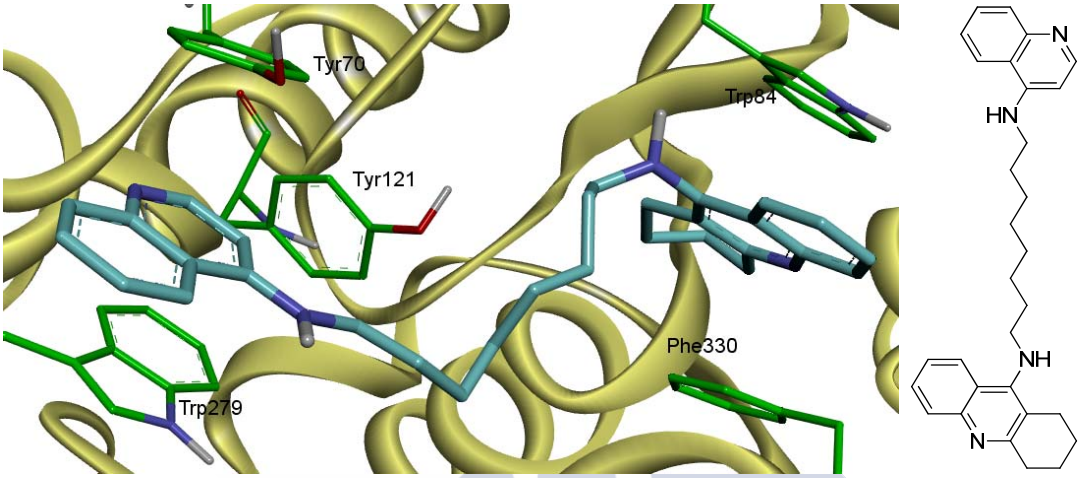


Figura 1.15.- Representación del modo de unión de un derivado de la *bis*-tacrina con el CAS y el PAS de *Tc*AChE. Complejo depositado con el código 1ODC en el PDB.

1.5.4.- Enzima butirilcolinesterasa.

La butirilcolinesterasa (BuChE) es una colinesterasa cuya efectividad en la catálisis de la hidrólisis de acetilcolina es inferior a la de AChE. La comparación de las secuencias de ambas proteínas indica un elevado nivel de homología, lo que se traduce en una elevada similitud entre las estructuras secundaria y terciaria de ambas proteínas, como se puede ver en la superposición de ambas en la Figura 1.16.[45] Sin embargo, el sitio aniónico periférico (PAS) de BuChE difiere de su homólogo en AChE. Como puede verse en esta figura, los residuos aromáticos Tyr 70 y Trp 279 presentes en AChE, necesarios para el apilamiento π con el ligando, han sido sustituidos por los residuos alifáticos Asn68 y Ala277, respectivamente, en BuChE. Como consecuencia de estas diferencias en el PAS de las dos enzimas, se puede inferir que un inhibidor capaz de inhibir AChE e incapaz de inhibir BuChE se enlazaría con el PAS de AChE, en lugar del CAS.

43. E.H. Rydberg, B. Brumshtein, H.M. Greenblatt, D.M. Wong, D. Shaya, L.D. Willians, P.R. Carlier, Y.-P. Pang, I. Silman, J. L. Sussman. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500
44. R. Schliebs, T. Arendt. *J. Neural. Transm.* **2006,** *113*, 1625-1644
45. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, JC. Fontecilla-Camps, F. Nachon. *J. Biol. Chem.* **2003,** *278*, 41141-41147

Existen indicios que indican que la inhibición de BuChE podría aumentar la efectividad de la terapia colinérgica.[46] Se ha observado que la inhibición de AChE es compensada por un incremento de la expresión de BuChE, lo que en cierta medida reduce la efectividad del tratamiento coligérnico centrado en AChE.

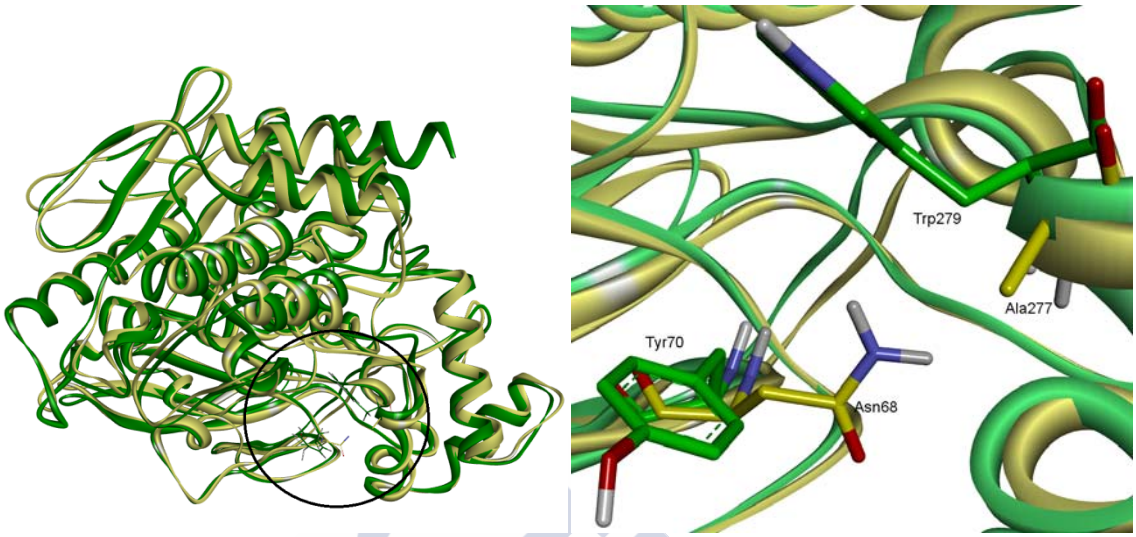


Figura 1.16.- *Izquierda:* Superimposición de la estructura apo de BuChE humana (PDB id. 1P0M, amarillo) y de la estructura de *Tc*AChE (PDB id. 1ODC, verde, se omite el ligando). *Derecha:* Ampliación del sitio aniónico periférico (PAS).

1.5.5.- Otras dianas en la cascada amiloide: α-secretasa y γ-secretasa.

Además de las dianas terapéuticas anteriormente indicadas, existen otras dianas como la α-secretasa o la γ-secretasa, que no describiremos en detalle dado que no forman parte de nuestros estudios.

La α-secretasa es una proteasa que compite con BACE-1 en el primer paso de la hidrólisis de la proteína APP. El punto de corte de la α-secretasa se encuentra dentro de la secuencia que pasa a formar el péptido β-amiloide, con lo que la actuación de la α-secretasa previene que la cascada amiloide resulte en la especie tóxica, como muestra la Figura 1.7 (Página 12).[47] La activación de α-secretasa podría ser, por tanto, un objetivo viable para el tratamiento de la EA. Sin embargo, una activación excesiva de esta enzima podría resultar en efectos secundarios nocivos, debido al procesamiento de sustratos como el factor de crecimiento epidérmico, que podría promover crecimientos tumorales. Además, existen resultados[48] que ponen en entredicho la efectividad de la activación de α-secretasa como posible ruta de tratamiento de la EA.

La *γ-secretasa* es el nombre que recibe el complejo proteico de transmembrana cuyo núcleo catalítico lo forma la presenilina-1, el primer miembro que se conoce de la familia de las aspartilproteasas de transmembrana. Li, Dang y colaboradores han dilucidado recientemente

46. M.I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, G.C. González-Muñoz, S. Conde, M.G. López, M. Villarroya, A.G. García, M.I. Rodríguez-Franco. *J. Med. Chem*. **2010**, *53,* 4927-4937
47. R. Postina. *J. Neurochem.* **2012,** *120* (sup. 1), 46-54
48. S. Sinha, I. Lieberburg. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **1999,** *96*, 11049-11053

la estructura de la presenilina proveniente del organismo *Methanoculleus marisgrini*.[49] La Figura 1.17 muestra las estructuras secundaria y terciaria de esta proteína, así como un primer plano de la díada aspártica, donde se observa que los residuos que la componen se encuentran a una distancia de aproximadamente 6.1 Å, superior a la habitual distancia de enlace de hidrógeno que presentan otras aspartilproteasas globulares como la pepsina.

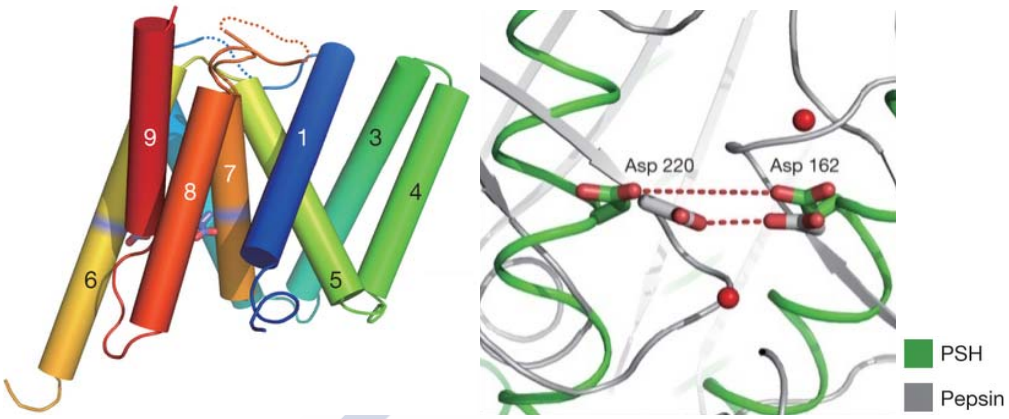


Figura 1.17.- Izquierda: Estructura del hómologo la presenilina-1 (PSH) estudiado por Li, Dang, y co. Derecha: comparación del sitio activo de PSH con una proteasa modelo (la pepsina) (Imágenes extraídas de ref. 49).

Como se ha dicho anteriormente, la γ-secretasa es la primera enzima del tándem de dos aspartilproteasas que participa en la última etapa de hidrólisis de la APP que genera los péptidos amiloides (Figura 1.7, Página 12). Otro de los sustratos importantes cuya reacción de hidrólisis es catalizada por la γ-secretasa es Notch:[50] la interferencia en los receptores de Notch podría causar diversos efectos nocivos en el organismo. Una ruta de aproximación posible para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer sería inhibir la capacidad de generación de fragmentos β-amiloides por parte de la γ-secretasa sin interferir en los procesos de hidrólisis de Notch, mediante fármacos moduladores de actividad. Este tipo de fármacos son capaces de regular la actividad proteica de manera que ciertos procesos catalíticos de la misma se ven inhibidos sin afectar gravemente el funcionamiento de otros. Algunos de estos fármacos, en particular un conjunto de fármacos antiinflamatorios no esteroides, han llegado a fases tardías de pruebas clínicas, como es el caso de Tarenflurbil (Figura 1.6, Página 10). Sin embargo, como ya hemos explicado en apartados anteriores, estos fármacos no han llegado a superar estas pruebas clínicas.[20]

La multifuncionalidad de este complejo proteico supone un obstáculo a mayores a superar que no se encuentra en BACE-1, lo que combinado con la carencia de suficiente información estructural de la γ-secretasa nos ha llevado a descartarla como objetivo de nuestros estudios y centrarnos en BACE-1.

49. X.Li, S. Dang, C. Yan, X. Gong, J. Wang, Y. Shi. *Nature* **2013,** *493*, 56-61
50. Para más información sobre Notch, véase por ejemplo: B. Westhoff, I.N. Colaluca, G. D'Ario, M. Donzelli, D. Tosoni, S. Volorio, G. Pelosi, L. Spaggiari, G. Mazzarol, G. Viale, S. Pece, P.P. Di Fiore. *Proc. Natl. Acad. USA* **2009**, *106*, 22293-22298

1.6.- INHIBIDORES MULTIDIANA.

La aproximación reduccionista, resumible a grandes trazos como "una patología, un objetivo, un fármaco", ha dominado el pensamiento científico en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer durante los últimos treinta años. Sin embargo, la falta de avance en el desarrollo de tratamientos efectivos para ésta ha puesto en entredicho la viabilidad de este paradigma de desarrollo de fármacos.[51] En la discusión sobre alternativas a este método reduccionista, uno de los nuevos planteamientos es el de la búsqueda de inhibidores multidiana.[52] Esto es, en lugar del desarrollo de un fármaco altamente específico dirigido a una única diana terapéutica, se buscaría un fármaco capaz de interaccionar de manera efectiva con varias de las posibles dianas farmacológicas de la enfermedad. Además, el diseño de un único fármaco multidiana ayudaría a evitar los efectos tóxicos que se suelen observar en los tratamientos que emplean múltiples fármacos.

Como hemos visto en los apartados anteriores, se han identificado varias posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, basándonos en la cascada β-amiloide: la inhibición de BACE-1, la inhibición del PAS de AChE, y la inhibición de la agregación de Aβ-42. Hemos discutido para cada una de estas dianas terapéuticas los desafíos propios que presentan a la hora de diseñar un fármaco que interaccione de la manera deseada con tales dianas. El desarrollo de un fármaco multidiana, aparte de responder efectivamente a estos desafíos, tiene un reto de diseño adicional: es necesario que el fármaco interactúe de manera efectiva con todas las dianas evitando que esta promiscuidad del fármaco resulte en interferencias no deseadas con objetivos no terapéuticos. Las elevadas diferencias entre los sitios de unión de las tres dianas elegidas supone una complicación añadida en el diseño de un fármaco efectivo capaz de interaccionar simultáneamente con dichas dianas: BACE-1 es una aspartil proteasa cuyo sitio activo se encuentra expuesto al disolvente, AChE es una colinesterasa con dos sitios de unión de ligandos separados por un canal de 15 Å, y la inhibición de la agregación de Aβ-42 requiere interactuar con cadenas peptídicas cortas.

51. P. T. Lansbury Jr. *Nature Med.* **2004**, *10*, S51-S57
52. M.L. Bolognesi, R. Matera, A. Minarini, M. Rosini, C. Melchiorre. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13,* 303-308

CAPÍTULO 2/CHAPTER 2.

OBJETIVOS/OBJECTIVES.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.1.- OBJETIVOS DE LA TESIS.

El objetivo final de la presente tesis doctoral es el diseño de compuestos cabeza de serie en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Para lograr este objetivo, hemos establecido como diana farmacológica prioritaria BACE-1, una aspartil proteasa anclada en la superficie de la membrana celular que debe desplazarse hasta la región endosomal en el interior de la célula para llevar a cabo su actividad catalítica a pH ácido. BACE-1 es una diana muy importante ya que cataliza la etapa clave de la hidrólisis de la proteína precursora amiloide (APP) que conduce a los péptidos Aβ. BACE-1 es una diana compleja, no sólo por el hecho de ser una aspartil proteasa cuya actividad catalítica depende del pH del medio, sino también por la plasticidad y exposición al disolvente de su sitio activo.

Los objetivos concretos que nos hemos planteado son los siguientes:

1º) Entender el efecto que ejerce la naturaleza química del inhibidor en el estado de protonación de los residuos ionizables del sitio activo en las aspartil proteasas a diferentes valores de pH, tomando como ejemplo dos aspartil proteasas de especial relevancia a nivel terapéutico: HIV-1 PR y BACE-1.

Este estudio será especialmente importante para el diseño de inhibidores de BACE-1, ya que se sabe que los inhibidores deben unirse a la enzima en la superficie celular, donde el pH es neutro, para ser cotransportados con la enzima al compartimento donde ésta ejerce su actividad catalítica.

2º) La estrategia más prometedora para la búsqueda de inhibidores de BACE-1 tiene como punto de partida el empleo de fragmentos. Por ello, se pretende preparar y optimizar un protocolo para el acoplamiento de fragmentos en BACE-1 que tenga en cuenta la variabilidad de los estados de protonación del ligando y de los residuos ionizables de la enzima, en función del pH. Para evaluar los resultados de protocolo propuesto utilizaremos estructuras cristalográficas publicadas de complejos de BACE-1 con ligandos, así como las afinidades de estos ligandos, obtenidas al pH de actividad óptima de la enzima.

3º) El tercer objetivo, y objetivo principal de esta tesis, se centra en el diseño de compuestos cabeza de serie para BACE-1 y otras dianas farmacológicas que participan en la cascada amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

Para la búsqueda de compuestos cabeza de serie para BACE-1 tendremos en cuenta la plasticidad de su sitio activo, así como la información adquirida en nuestros estudios previos sobre la influencia de los estados de protonación del ligando y la proteína en los cálculos de acoplamiento. Se buscarán además aquellas modificaciones estructurales sobre los compuestos que les permitan inhibir otras dianas de la cascada amiloide de la enfermedad de Alzheimer, específicamente AChE y la agregación de péptidos Aβ.

Se elegirán aquellos compuestos que resulten más prometedores para llevar a cabo su síntesis y evaluación farmacológica, en colaboración con otros grupos de investigación de la USC y otras universidades europeas. Como en todo proceso de descubrimiento de fármacos, se hace necesario un proceso iterativo para mejorar la afinidad de los compuestos diseñados para BACE-1 y las otras dianas elegidas.

2.2.- THESIS OBJECTIVES.

The main objective of this thesis is the design of drug lead candidates for the treatment of Alzheimer's disease (AD). For this purpose, we have chosen BACE-1 as a key pharmacological target: an aspartyl protease bound to the cell surface, which relocates to the endosomal region inside the cell where it carries out its catalytic activity at an acidic pH. BACE-1 is a critical target due to its involvement in the rate determining step of the Amyloid Precursor Protein (APP) hydrolysis that results in Aβ peptides. BACE-1 is a complex target, not only because marked catalytic rate pH dependence, but because of the plasticity and high solvent exposure of its active site.

The specific objectives set out to perform are the following:

1st) We intend to understand the effect of the inhibitor's chemical nature on the protonation state of the aspartyl proteases active site titrable residues at a range of pH values, using two aspartyl proteases particulary important as therapeutic targets: HIV-1 PR and BACE-1.

This study should be highly relevant for the design of BACE-1 inhibitors, since it is known that the inhibitors bind to the enzyme at the cell surface, at a neutral pH, and then the protein-inhibitor complex translocates to the endosomes, where BACE-1 performs its catalytic activity.

2nd) The most promising strategy for BACE-1 inhibitor lead search starts with the discovery of fragment leads. Therefore, we intend to develop a protocol for highly accurate fragment docking in BACE-1 that takes into account the protonation state variability for both ligand and enzyme titrable residues, as a function of pH. As a testing ground we will employ some of the published crystallographic structures of BACE-1/ligand complexes, as well as their ligands binding affinities obtained at the optimal catalytic pH.

3rd) The last, and probably the central objective of this thesis, will be the design of drug leads that could bind to BACE-1 and other pharmacological targets in the amyloid cascade, responsible for AD.

For the BACE-1 lead compounds we will take into account the plasticity of this enzyme's active site, as well as the information gained on our previous studies on the influence of the protonation state of ligand and protein on the docking calculations. Our multi-target strategy should lead us to the search of ligand structural modifications aimed at improving their viability as inhibitor of other targets in the amyloid pathway, namely AChE and the Aβ peptide aggregation.

The most promising compounds in the docking simulations will be synthesized and pharmacologically evaluated in collaboration with other USC and European universities research teams. As with all drug discovery processes, the multi-target objective will have to undergo an iterative pathway, aimed at improving the affinity of the designed compounds for BACE-1 and the other chosen targets.

CAPÍTULO 3.

ASPARTIL PROTEASAS:

EFECTO DEL pH EN LA INHIBICIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1.- INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.

3.1.1.- Estructura de las aspartilproteasas.

Todos los sistemas biológicos requieren la hidrólisis de péptidos y proteínas para muchas de sus funciones. La hidrólisis de péptidos la llevan a cabo el conjunto de enzimas conocidas como peptidasas, proteasas, o peptil-hidrolasas. La actividad proteolítica de estas enzimas es vital para la regulación de diferentes procesos que incluyen varias actividades de respuesta rápida, crecimiento celular, homeostasis de tejidos y la estimulación de la división celular en todos los tipos de organismos. Esto se aplica incluso a entidades como el virus de la inmunodeficiencia humana (Human Inmunodeficiency Virus o HIV), que secuestra la maquinaria celular de su huésped y la emplea en su propia replicación.

Uno de los grupos más importantes de enzimas proteolíticas, desde el punto de vista terapéutico, es el de las aspartil proteasas. Estas enzimas se han convertido en dianas terapéuticas[53] para una gran variedad de enfermedades, como infecciones bacterianas[54,55,56] y fúngicas,[57] algunas variedades de cáncer,[58,59] y enfermedades neurodegenerativas.[23] La importancia de esta familia de proteínas se ve resaltada por los numerosos libros y reviews publicados sobre el tema.[60,61,62] Uno de los proyectos de diseño racional de fármacos basado en estructura más exitoso implicó el desarrollo de inhibidores de la proteasa de HIV-1 (HIV-1 PR, una aspartil proteasa vírica) como parte de la terapia multifármaco conocida como HAART (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*, o terapia antirretroviral de alta actividad).[53] HIV-1 PR se ha convertido en una de las enzimas más estudiadas en el proceso de diseño de fármacos, tanto experimental como computacionalmente. Otro miembro de esta familia enzimática, la renina, participa en la regulación de la presión sanguínea mediante su papel en el sistema renina-angiotensina. Recientemente, un esfuerzo de 30 años ha culminado en el desarrollo del primer inhibidor de renina empleado en procesos clínicos.[53,63] BACE-1 es otro miembro de esta familia que ha ascendido al rango de diana terapéutica de la EA, dada su implicación en el proceso hidrolítico que lleva a la amiloidosis.[23,53,62]

Tanto BACE-1 como la proteasa del HIV pertenecen al clan AA de las aspartil proteasas, y se separan respectivamente en la familia A1 (aquellas de origen eucariota) y la familia A2 (de fuentes retrovirales, como el HIV), de acuerdo con la base de datos MEROPS.[64]

53. A.K. Ghosh. "Aspartic proteases as therapeutic targets". *Weinheim: Wiley-VCH* **2010**
54. C. Boss, O. Corminboeuf. C. Grisostomi, T. Weller. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 295-317
55. M.K. Holloway, P. Hunt, G.B. McGaughey. *Drug Dev. Res.* **2009,** *70,* 70-93
56. M.J. Meyers, D.E. Goldberg. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 445-455
57. L.A. Braga-Silva, A.L. Santos. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2401-2419
58. E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prébois, H. Rochefort, F. Vignon. *Cancer Lett.* **2006**, *237,* 167-179
59. H. Rochefort, M. García, M. Glondu, V. Laurent, E. Liaudet, J.M. Rey, P. Roger. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 157-170
60. B.M. Dunn, "Structure and function of the aspartic proteinases". *New York; Plenum Press* **1991**
61. M.N.G. James. "Aspartic proteinases: Retroviral and cellular enzimes." *New York: Plenum Press* **1998**
62. J- Varghese. "BACE: Lead target por orchestrated therapy of Alzheimer's disease." *Weinheim: Wiley-VCH* **2010**
63. M.R. Weir. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2007,** *13,* 739-766
64. N.D. Rawlings, A.J. Barret, A. Bateman. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *49*. D343-359. Base de datos disponible en: http://www.merops.sanger.ac.uk

Algunos de los aspectos más distintivos de estas enzimas son su estructura secundaria, basada en una arquitectura de láminas β, así como su maquinaria catalítica formada por dos residuos de ácido aspártico, localizados en la base de una hendedura formada por dos hebras β. Se ha identificado una molécula de agua ubicada entre estos dos residuos aspárticos integrantes de la diada catalítica como el nucleófilo del proceso hidrolítico catalizado por estas enzimas.[53,61,62]

Generalmente, las células secretan enzimas de la familia A1 como proenzimas inactivas que, en la mayoría de casos, se activan autocatalíticamente a pH ácido. Su estructura consta de dos lóbulos homólogos, hecho que hace evidente la evolución por duplicación génica de los miembros de esta familia. El sitio catalítico está situado entre ambos lóbulos de la molécula, cada uno de los cuales aporta uno de los dos ácidos aspárticos componentes de la díada catalítica, además una estructura de tipo *'flap'* u horquilla que contiene un residuo de Tirosina controla la especificidad. La peptidasa arquetipo de esta familia, la pepsina A, cataliza la proteolisis de las proteínas alimentarias en el estómago en los vertebrados y fue la segunda enzima determinada por cristalografía.[65] La Figura 3.1 ilustra de manera esquemática el ectodominio de BACE-1, una enzima de la familia A1.

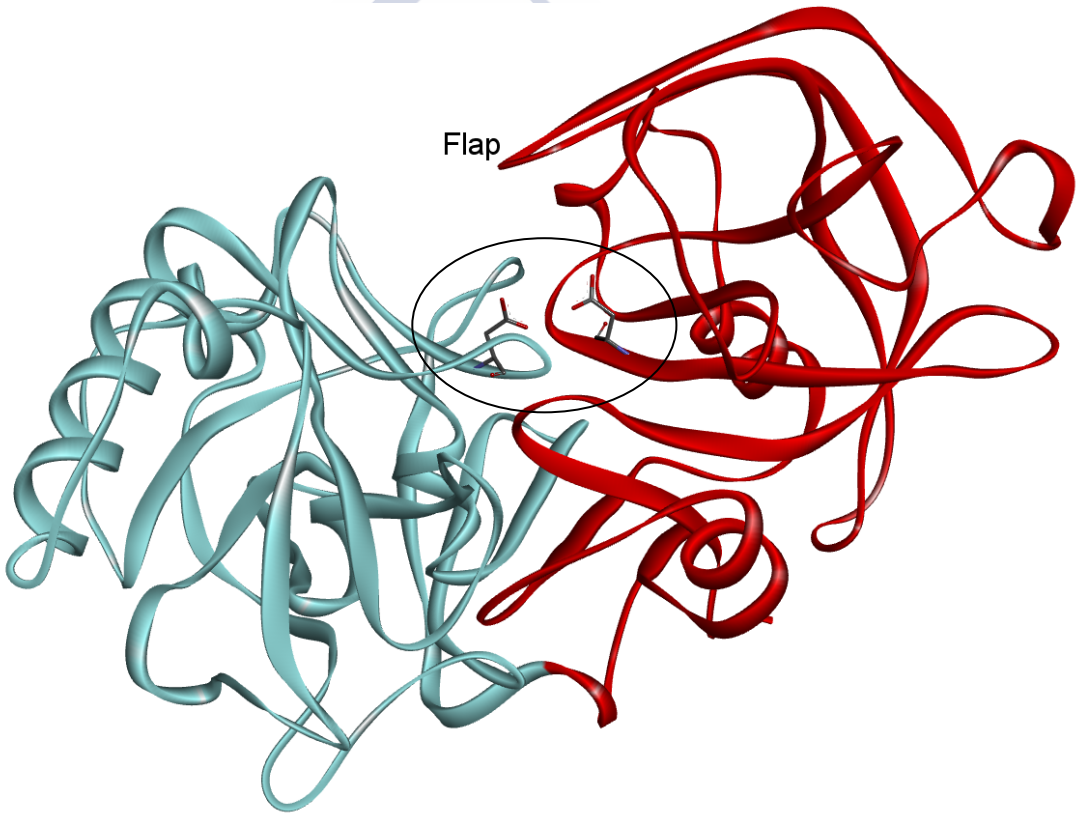


Figura 3.1. Representación esquemática que muestra el ectodominio de BACE-1 (PDB id. 1FKN) incluidas las cadenas laterales de la díada aspártica catalítica (enmarcadas en negro). Los lóbulos N- y C-terminal se ilustran en rojo y azul, respectivamente.

La familia A2 (retropepsinas) se descubrió a finales de los años 80 como resultado del papel esencial de la enzima HIV-1 PR en la maduración del virus de inmunodeficiencia humana responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estas retropepsinas son

65. J.H. Nonthrop. *J. Gen. Physiol.* **1930**, *13*, 739-766

activas únicamente como homodímeros. La Figura 3.2 muestra una representación esquemática de HIV-1 PR, donde se aprecia cómo los monómeros están estructuralmente relacionados con cada uno de los lóbulos de las proteínas de la familia A1, y además incluyen un elemento estructural equivalente a la horquilla de las aspartil proteasas tipo pepsina.

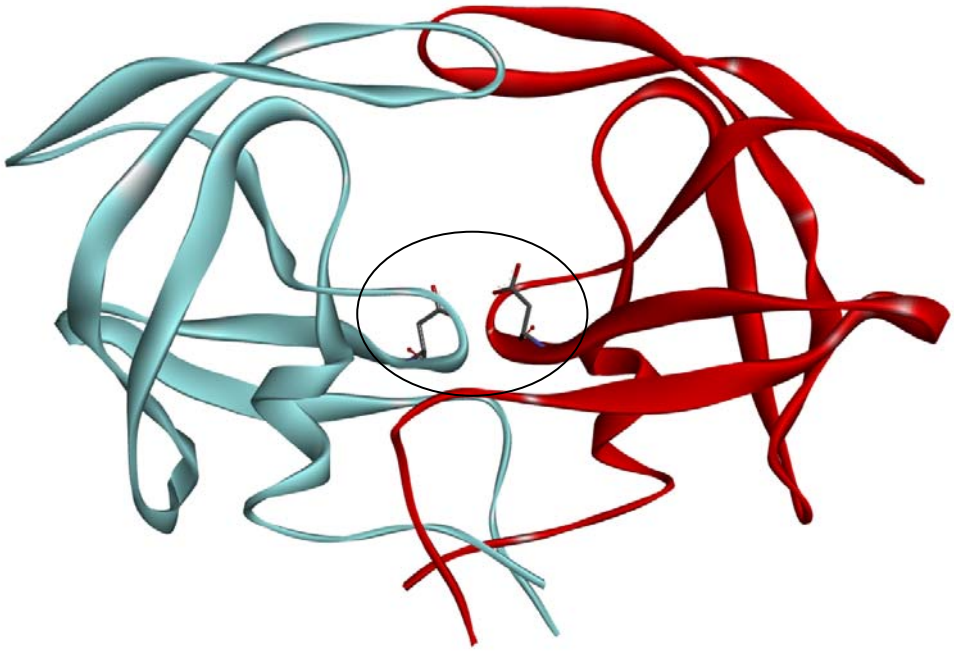


Figura 3.2. Representación esquemática del dímero de HIV-1 PR (PDB id. 3HVP), incluidas las cadenas laterales de la díada aspártica catalítica (enmarcadas en negro). Cada monómero se ilustra en un color diferente.

3.1.2.- Mecanismo catalítico de las aspartilproteasas.

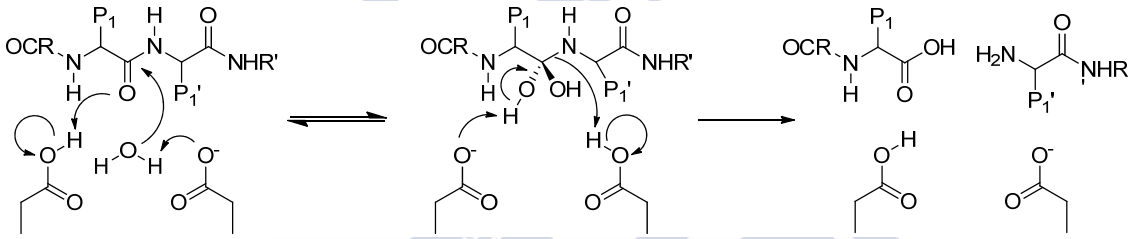
Como hemos mencionado anteriormente, las aspartil proteasas se caracterizan por la presencia de dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo, cuyas cadenas laterales carboxílicas se implican en la catálisis. Estas enzimas operan a pH ácido (p.e. la pepsina, adaptada al entorno ácido del estómago, opera a pH 2-4). Este requisito de pH se justifica al estudiar el mecanismo de estas enzimas, ya que uno de los dos residuos aspárticos debe estar protonado y el otro cargado para que se pueda dar actividad enzimática, como explicaremos en los siguientes párrafos. El Esquema 3.1 (ya comentado con anterioridad en la Página 14) muestra el mecanismo catalítico, que incluye el ataque nucleófilo de una molécula de agua en el sitio activo al carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar, generando un intermedio tetraédrico de tipo gem-diol.[66] El diseño de la primera generación de inhibidores suele contener un análogo de este intermedio tetrahédrico insertado en péptidos cortos.

La conformación de los residuos aspárticos en el sitio activo formado en la interfase dimérica en HIV-1PR es indistinguible de la estructura que presentan las aspartil proteasas monoméricas (tipo pepsina). Por ello es razonable sugerir que tanto las aspartil proteasas

66. T.D.H. Bugg. "Introduction to enzime and coenzime chemistry", 2nd ed. *Oxford: Blackwell* **2004**.

retrovirales como las eucariotas catalizan mediante mecanismos químicos similares.[67] En la disposición de la díada aspártica catalítica, los dos oxígenos carboxílicos más próximos entre sí se orientan hacia el interior de la proteína y se conocen como oxígenos internos, mientras que los dos oxígenos carboxílicos más alejados entre sí se conocen como oxígenos externos.

Los dos grupos carboxílicos asumen roles ácido-base opuestos en el proceso catalítico: el ácido cargado lleva a cabo la desprotonación del agua clave en la hidrólisis mientras el ácido protonado polariza el oxígeno del carbonilo del enlace peptídico hidrolizable. Estudios comparativos de Andreeva y Rumsh[68] han demostrado que la interacción de los oxígenos externos de la díada catalítica con los residuos del entorno del sitio activo contribuye a mantener la carga negativa de uno de los residuos aspárticos y el estado neutro del otro, independientemente del valor de pH. Este sistema de regulación es característico de las proteasas de organismos eucariotas, funcionando a diversos valores de pH, y es el resultado de su adaptación evolutiva. Las estructuras homodiméricas simples presentes en las proteasas retrovirales carecen de este sistema regulador, por lo que su funcionamiento se restringe a un estrecho margen de valores de pH común a todas ellas, no muy alejado del pK_a del grupo carboxilo, y la asimetría de carga del sitio activo es consecuencia de la unión del sustrato.[68]



Esquema 3.1. Mecanismo catalítico general de las aspartil proteasas.

3.1.3.- Efectos del inhibidor en el estado de protonación del sitio activo de las aspartilproteasas.

La importancia del estado de protonación del sitio activo en la catálisis y diseño de nuevos inhibidores de aspartilproteasas ha fomentado una gran cantidad de estudios en esta área, tanto experimentales como teóricos. La mayor parte del trabajo relativo al estudio de la carga del sitio activo cuando la enzima se encuentra unida a un inhibidor específico se ha centrado en la díada aspártica catalítica. [69,70,71]

Los primeros estudios computacionales[72] se basaron en dinámicas moleculares de estructuras de complejos de HIV-1 PR con dos inhibidores, partiendo de la proteína en uno de los posibles estados de protonación (di-, mono- y desprotonado). El objetivo era buscar el estado de protonación de la díada aspártica que mantuviese la intrincada red de enlaces de hidrógeno observada en la estructura cristalográfica entre cada uno de estos ligandos y la región del sitio activo de la enzima, lo que lo identificaría como el estado de carga más probable. Los

67. L.J. Hyland, T.A. Tomaszek Jr., T.D. Meek. *Biochemistry* **1991**, *40*, 8454-8463
68. N.S. Andreeva, L.D. Rumsh. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2439-2450
69. B. Veerapandian, J.B. Cooper, A. Sali, T.L. Blundell, R.L. Rosati, B.W. Dominy, D.B. Damon, D.J. Hoover. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 322-328
70. M.N.G. James, A.R. Sielecki, K. Hayakawa, M.H. Gelb. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3872-3886
71. A.M. Silva, R.E. Cachau, H.L. Sham, J.W. Erickson. *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 321-346
72. W.E. Harter Jr., D.L. Beveridge. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3883-3886

resultados indican que, de todos los posibles estados de carga, sólo uno reproduce adecuadamente los datos cristalográficos de cada inhibidor, y resultó ser diferente para cada uno de los inhibidores estudiados.[72] Los trabajos de dinámica molecular en otras aspartil proteasas como BACE-1[73,74] y plasmepsina 2[75] se limitaron a emplear un estado de carga monoprotonado en la díada aspártica. Por ejemplo, en el caso de BACE-1 complejada con el inhibidor peptídico OM99-2 se llevaron a cabo dos trayectorias paralelas de dinámica molecular para determinar el estado de protonación favorecido para la díada catalítica. El resultado muestra que un enlace fuerte de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del inhibidor y el aspártico 228 se mantiene únicamente cuando el aspártico 32 está protonado y el 228 está cargado.[73]

Además de simulaciones de dinámica molecular, también se han aplicado cálculos de mecánica cuántica para estudiar el estado de protonación de la díada.[76,77,78] Por ejemplo, Rajamani y Reynolds[78] han explorado el estado de ionización más favorable tanto para Asp32 como Asp228 en BACE-1 mediante el uso de cálculos de mecánica cuántica de escalado linear en los que los penalizadores por desolvatación se calculan por una aproximación Poisson-Boltzmann. Para posibilitar estos cálculos se tuvo que reducir de manera drástica el tamaño de la estructura enzima-ligando. Los resultados de esta aproximación mecanocuántica favorecen el estado monoprotonado, con el protón ubicado en el Asp228, contradiciendo los resultados anteriores de Park y Lee[73] y de Caflisch.[74] Además, estos cálculos apoyan la existencia de una díada aspártica catalítica neutra cuando la enzima se encuentra en forma apo. Sin embargo, tanto los cálculos mecanocuánticos como de dinámica molecular se basan en la estructura cristalográfica de rayos X, obtenida a valores de pH superiores al pH de actividad óptimo de la enzima (pH 4.5), por lo que el estado de ionización podría ser distinto al pH óptimo para catálisis.

Otra aproximación aplicable a la predicción del efecto del inhibidor en el estado de carga de la díada aspártica catalítica se basa en cálculos de Poisson-Boltzmann, que permiten la predicción del estado de protonación de un residuo ionizable a cualquier intervalo de pH.[79] Para comprobar el efecto de esta variable en el estado de carga real de la díada catalítica Polgár y Keserü[80] han calculado la fracción de protonación a través del pH de estos residuos mediante un proceso de Poisson-Boltzmann iterativo que permite el cambio de carga de todos los residuos polares enterrados. Estos estudios también favorecen el estado monoprotonado, pero con el protón localizado en el Asp 32 tanto en forma apo como holo, en disonancia con los cálculos de Rajamani y Reynolds.[78]

El estado de ionización de la díada aspártica debería ser esencial en la predicción de conformación y enriquecimiento de *hits* en experimentos de acoplamiento de ligandos (*docking*). Varios autores han usado el estado monoprotonado como plantilla de proteína para

73. H. Park, S. Lee. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125*, 16416-16422
74. D. Huang, U. Lüthi, P. Kolb, M. Cecchini, A. Barberis, A. Caflisch. *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 5436-5443
75. R. Friedman, A. Caflisch. *FEBS Lett.* **2007,** *581*, 4120-4124
76. B.G. Rao, U.C. Singh. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6735-6750
77. N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, N. Liao, C.H. Reynolds, K.M. Merz Jr., *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1057-1069
78. R. Rajamani, C.H. Reynolds. *J. Med. Chem*. **2004,** *47,* 5159-5166
79. J. Trylska, J. Antosiewicz, M. Geller, C.N. Hodge, R.M. Klabe, M.S. Head, M.K. Gilson. *Protein Sci.* **1999**, *8*. 180-195
80. T. Polgár, G.M. Keserü. *J. Med. Chem.* **2005,** *48,* 3749-3755

el análisis de voluminosas bases de datos con resultados contradictorios.[74,80] Aunque Polgár y Keserü[80] han demostrado mediante el empleo de diversos protocolos de acoplamiento que su asignación de protones aumenta significativamente el enriquecimiento de ligandos, el grupo de Caflisch[74] ha demostrado que los compuestos más activos obtienen un mejor resultado únicamente cuando se emplea la asignación de carga opuesta. Por ello, el único resultado consensuado de estos estudios es que la díada catalítica de BACE-1 probablemente posee una carga de -1, comparable a la de otras aspartil proteasas. Tal y como veremos en los siguientes apartados, los estudios llevados a cabo en nuestro[81,82,83] y otros laboratorios (e.g. [67,84]) indican claramente que el estado de carga del sitio activo de una aspartil proteasa depende de la naturaleza química del ligando, por lo que asumir un único estado de carga para el sitio activo de una aspartil proteasa cuando se llevan a cabo campañas de búsqueda *in* silico puede llevar a falsos positivos y falsos negativos.

3.1.4.- Aproximaciones experimentales. Nuevas rutas de predicción del estado de carga de las aspartilproteasas: la aproximación SPR/MM.

Algunos de los ensayos de afinidad empleados en estudios experimentales pueden presentar carencias originadas en el régimen competitivo con el sustrato, cuya capacidad de enlace y catálisis puede también depender del pH del entorno.[81,84] Este problema se puede resolver en parte empleando sustratos que carezcan de residuos ionizables, como es el caso del trabajo de Hyland y colaboradores,[67] cuyos estudios basados en el empleo del pH como sonda para medir la constante inhibición en un rango de valores de acidez indican que la estructura química del inhibidor influye en gran medida en el estado de carga de los residuos ionizables ubicados cerca de y en el sitio activo de las aspartil proteasas. Sin embargo, la carencia de opciones estructurales que supone la necesidad de no poseer grupos ionizables en el sustrato limita la versatilidad de estos experimentos.

En este estudio, hemos propuesto un método alternativo para predecir los valores de pK_a de los grupos ionogénicos del sitio activo en un complejo enzima-inhibidor que combina la determinación experimental del valor de afinidad de enlace del inhibidor a distintos valores de pH con un protocolo computacional diseñado para explicar las tendencias experimentales observadas, basado en la predicción de los valores de pK_a de los grupos ionogénicos de proteína e inhibidor. Este nuevo método es posible gracias al desarrollo de ensayos de afinidad mediante Resonancia de Plasmón Superficial (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) y de técnicas computacionales que permiten una predicción rápida y fiable de los estados de protonación de los residuos ionogénicos de la proteína a un pH determinado. Por una parte, los ensayos de afinidad de enlace de SPR evitan problemas recurrentes presentes en análisis de FRET (*Föster resonance energy transfer*) ya que SPR no necesita un protocolo basado en un régimen

81. J.L. Domínguez, T. Christopeit, M.C. Villaverde, T. Gossas, J.M. Otero, S. Nyström, V. Baraznenok, R. Lindström, U.H. Danielson, F. Sussman. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7255-7263
82. F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, J.C. Estévez, R.J. Estévez. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3084-3085
83. J.L. Domínguez, T. Gossas, M.C. Villaverde, U.H. Danielson, F. Sussman. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4838-4847
84. T. Gossas, U.H. Danielson. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16,* 203-212

competitivo con un sustrato, cuyo enlace y catálisis puede depender del pH.[81,85,86] Además, las aproximaciones de tipo Generalized Born (GB) a la solución de la ecuación de Poisson-Boltzman permiten una evaluación más rápida y precisa del pK_a de los residuos ionizables de la proteína cuando ésta está ligada a un inhibidor,[87,88] un paso cuyo objetivo es asignar los estados de protonación de los residuos de la proteína (a un valor de pH dado) en la estructura que sirve como punto de partida de las simulaciones de mecánica molecular. Las conformaciones resultantes de estas simulaciones se emplean para evaluar las energías de interacción enzima-ligando por medio de una función de evaluación basada en mecánica molecular, para racionalizar los resultados de SPR.

3.2.- ESTUDIOS SOBRE BACE-1.

Comenzaremos describiendo los estudios en la β-secretasa, o BACE-1. La importancia de esta proteína como diana farmacológica en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se ha revisado en la introducción general de la tesis. Uno de los objetivos principales de este estudio es determinar el efecto de la presencia de diferentes inhibidores en la carga de todos los residuos ionizables de esta proteína. La Tabla 3.1 muestra los inhibidores elegidos para el estudio. Como se puede ver en la misma, los inhibidores estudiados presentan cierta variedad de motivos estructurales y motivos de anclaje a la proteína.

3.2.1.- Metodología.

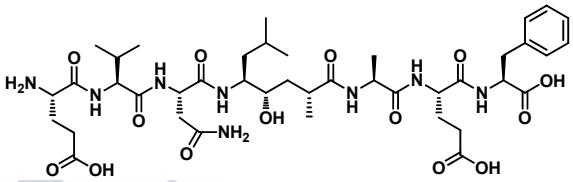
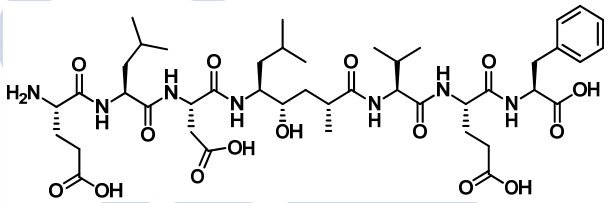
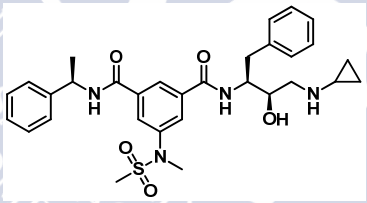
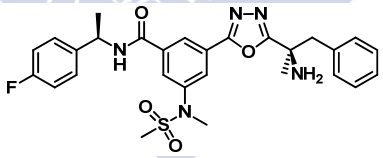
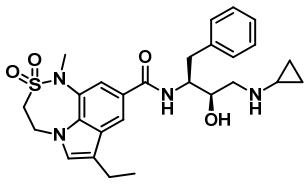
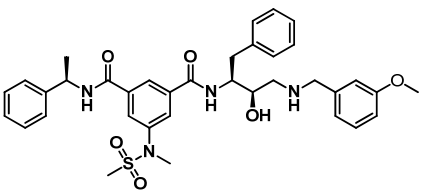
3.2.1.1.- Analisis de interacciones con biosensores de SPR y estudios de actividad celular.

Nuestros colaboradores del grupo dirigido por la profesora Helena Danielson en la Universidad de Uppsala, Suecia, llevaron a cabo los experimentos de SPR para determinar las afinidades de los inhibidores descritos en la Tabla 3.1. Los inhibidores **I-2**,[89] **I-3**,[27] **I-4**,[90] **I-5**,[91] e **I-6**,[92] se sintetizaron de acuerdo con metodología publicada en la bibliografía; **I-1** (OM99-2)[25] se obtuvo de Sigma-Aldrich, San Luis, Missouiri. BACE-1 se expresó en *Escherichia coli* y se purificó hasta homogeneización siguiendo procedimientos publicados anteriormente.[93]

85. P.O. Markgren, M.T. Lindgren, K. Gertow, R. Karlsson, M. Hämäläinen, U.H. Danielson. *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 207-218
86. M. Karlsson, Y.M. Pavlov, M. Malmqvist, B. Persson, M. Ehrenberg. *Biochimie* **1999**, *81*, 995-1002
87. W. Im, M.S. Lee, C.L. Brooks III. *J. Comput. Chem*. **2003**, *24*. 1691-1702
88. V.Z. Spassov, L. Yan. *Protein Sci.* **2008,** *17,* 1955-1970
89. L. Hong, R. Turner III, G. Koelsch, D. Shin, A.K. Ghosh, J. Tang. *Biochemistry* **2002**, *41,* 10963-10967. Detalles sobre la síntesis del inhibidor OM00-3 se pueden encontrar en la Tesis Doctoral de José Manuel Otero Casas (2007), Universidad de Santiago de Compostela (España).
90. H.A. Rajapakse, P.G. Nantermet, H.G. Selnick, S. Munshi, G.B. McGaughey, S.R. Lindsley, M.B. Young, M.T. Lai, A.S. Espeseth, X.P. Shi, D. Colussi, B. Pietrak, M.C. Crouthamel, K. Tugusheva, Q. Huang, M. Xu, A.J. Simon, L. Kuo, D.J. Hazuda, S. Graham, J.P. Vacca. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7270-7273
91. N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dundson, P. East, J. Hawkins, C. Howes, I. Hussain, P. Jeffrey, G, Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne. *J. Med. Chem.* **2008,** *51,* 3313-3317
92. A.K. Ghosh, N. Kumaragurubaran, L. Hong, S. Kulkarni. X. Xu, H.B. Miller, D.S. Reddy, V. Weerasena, R. Turner, W. Chang, G. Koelsch, J. Tang. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18,* 1031-1036
93. M. Back, K. Nyhlén, I. Kvarnstörm, S. Appelgren, N. Borkakoti, K. Jansson, J. Lindberg, S. Nyström, A. Hallberf, S. Rosenquist, B. Samuelsson. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9471-9486

Todos los estudios de interacción se llevaron a cabo a 25ºC en un equipo SPR Biacore 2000 o Biacore S51 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La interacción se midió en unidades de resonancia (RU) en función del tiempo y se presenta como sensogramas, con datos de una serie de concentraciones de inhibidor superimpuestas para cada experimento. Los datos se analizaron con el software BIAevalution 4.1 (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia), determinando los parámetros cinéticos mediante el uso de análisis normalizados de regresión global no lineal y un modelo de enlace 1:1 con transferencia de masa de las fases completas de asociación y disociación.

Tabla 3.1.- Estructura química de los inhibidores de BACE-1 estudiados.

PDB Id	Nombre	Estructura
1FKN	**OM99-2 (I-1)**	
1M4H	**OM00-3 (I-2)**	
2B8L	**I-3**	
2IRZ	**I-4**	
2VNN[a]	**I-5**	
2VKM	**I-6**	

[a] El complejo Inhibidor/BACE-1 para I-5 se obtuvo por homología con el complejo 2VNN

Para el ensayo de actividad celular se cultivaron células HEK293 que expresan de manera estable el mutante Sueco de APP,[94] a las que se añadió el inhibidor a distintos valores de concentración. Después de 24 horas, se recolectó el medio de cultivo celular, y se determinó la cantidad de péptido Aβ mediante abx40 ELISA (The Genetics Co. Schlieren, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.2.1.2.- Protocolos de simulación para la predicción del pK_a y afinidad de Enlace.

Para nuestros cálculos consideramos todos los compuestos descritos en la Tabla 3.1, a excepción del compuesto **I-6**, dado que su baja velocidad de disociación sólo permitió proponer un límite superior de K_D (K_D < 10 nM). Descargamos las estructuras del resto de complejos de los inhibidores descritos en la Tabla 3.1 del PDB, y añadimos hidrógenos a la estructura cristalográfica empleando la suite de programas de Discovery Studio.[95] Algunas de las estructuras carecen de residuos entre 158 y 169 (2B8L, 2IRZ) o entre los residuos 157 y 167 (2VNN*). Para completar estas cadenas, empleamos como modelo la secuencia homóloga del complejo 1FKN. Una inspección más detalla de las estructuras reveló que los extremos de la cadena en estos huecos estaban distorsionados, con lo que se ajustaron siguiendo los ángulos de torsion de la región del 1FKN correspondientes; una vez ajustados estos segmentos, se introdujeron los fragmentos de cadena necesarios para completar la estructura, enlazándolos a los extremos recolocados. Para optimizar estos segmentos de inserción, empleamos un protocolo de Steepest Descent con un gradiente de tolerancia de 0.1 kcal/(mol·Å^2), con un campo de fuerzas de tipo CHARMM,[96] disponible en el software Discovery Studio. Dado que las coordenadas del complejo BACE-1/**I-5** no han sido publicadas, las hemos generado por homología a partir del complejo 2VNN reemplazando la función *meta*-(trifluorometil)bencil del inhibidor en este complejo[91] por un fragmento ciclopropilo, presente en el inhibidor **I-3**.

Calculamos los valores de pK_a de todos los residuos ionizables de la proteína en el rango de pH de 2-12, según el protocolo propuesto por Spassov y Yan,[88] implementado en Discovery Studio, llamado Cálculo de Ionización de Proteína y pK_a de Residuo (Calculate Protein Ionization and Residue pK_a, CPIRpK). Este protocolo, que emplea una aproximación de tipo Generalized Born para reproducir los efectos del disolvente, permite la determinación iterativa del pK_a de residuos que interaccionan entre sí. Las constantes dieléctricas internas y externas empleadas para este cálculo fueron 10 y 80 respectivamente, la fuerza iónica fue 0.145, y el límite de energía para el clústering fue de 0,5 kcal/mol. Las cargas empleadas en estos cálculos se obtuvieron del campo de fuerzas CHARMM.[96] El protocolo empleado se aplica a todos los residuos de la proteína y a los residuos de aminoácido que forman parte de los inhibidores péptidomiméticos. Así pues, este algoritmo fue capaz de predecir los valores de pK_a (y en consecuencia la fracción de protonación a un pH dado) para los aminoácidos ionizables de la enzima y los inhibidores **I-1** e **I-2**. Los grupos amino protonados de los inhibidores **I-3** a **I-5** pueden alcanzar valores de pK_a de 10 o más, con lo que los hemos dejado cargados. Estos cálculos producen curvas de titulación que muestran la fracción de de protonación de cada

94. M. Citron, T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Leberburg, D.J. Selkoe. *Nature* **1992**, *360,* 672-674
95. Discovery Studio vs. 2.1, 2.5 y 3.0. Accelrys Inc. San Diego, CA.
96. F.A. Momany, V.J. Klimkowski, L. Schäfer. *J. Comput. Chem.* **1990,** *11*, 654-662

residuo ionogénico a cada valor de pH del intervalo. El módulo de Discovery Studio también genera el estado de protonación mayoritario a un valor dado de pH, protonando aquellos residuos con una fracción de protonación mayor de 0.5. En algunos complejos BACE-1/inhibidor nos encontramos con una fracción de protonación próxima a 0.5 para los carboxilos de algunos residuos. En estos casos, hemos generado también el estado de protonación alternativo para ese residuo, para su empleo en los cálculos de afinidad.

Para llevar a cabo nuestros cálculos de afinidad de enlace, elegimos los estados de protonación mayoritarios a pH 4.5 y pH 7.4, según las predicciones de pK_a de Discovery Studio.[88] Sometimos las estructuras resultantes a un protocolo de optimización de mecánica molecular multietapa. En la primera minimización de energía mantuvimos fijos todos los átomos pesados, mientras en la segunda empleamos restricciones de tipo NOE en los átomos pesados que participan como dadores/aceptores en los enlaces de hidrógeno entre ligando y proteína. Cada una de las minimizaciones de energía (ME) se compuso de dos segmentos: el primero una ME de tipo Steepest Descent de 2000 pasos y el segundo de una ME con protocolo de optimización tipo ABNR de 50000 pasos. El gradiente de tolerancia para estos cálculos fue de 0.001 kcal/(mol·Å^2). La estructura resultante pasó por un protocolo NVT de dinámica molecular (DM) de una duración aproximada de 0.5 ns, divididos en 6 ps de calentamiento, 60 ps de equilibración, y 400 ps de producción a 300K. Durante el proceso de ME y DM empleamos un término de solvatación implícita basado en la aproximación de Generalized Born con cambio sencillo (Generalized Born with Simple Switching, GBSW).[87] Durante la producción de DM se recogieron conformaciones moleculares cada 2 ps para el subsiguiente análisis de la energía de interacción ligando-proteína. Ésta se determinó mediante una función de evaluación basada en la media de la diferencia de energía entre el complejo enzima-inhibidor y la suma de sus componentes, para un conjunto de conformaciones generadas por DM. Por ello, la función de evaluación de afinidad de enlace se puede describir como:

$$<\Delta Gbind> = <\Delta Gmm(P:L) - \Delta Gmm(P) - \Delta Gmm(L) + \Delta Ggb(P:L) - \Delta Ggb(P) - \Delta Ggb(L)> \quad (3.1)$$

donde ΔGmm y ΔGgb indican los componentes de mecánica molecular del campo de fuerzas CHARMM[96] y la solvatación GBSW,[87] respectivamente, para el complejo ligando-proteína (P:L), proteína (P), y ligando (L). En algunos casos, existe la posibilidad de que ambos estados de protonación de un residuo acídico dado estén altamente poblados a un valor de pH específico. Para estos casos, obtuvimos la función de evaluación final mediante la ponderación del valor de evaluación para ambos estados de protonación:

$$\Delta Gbind = X_1\, \Delta Gbind(0) + (1-X_1)\, \Delta Gbind(-1) \quad (3.2)$$

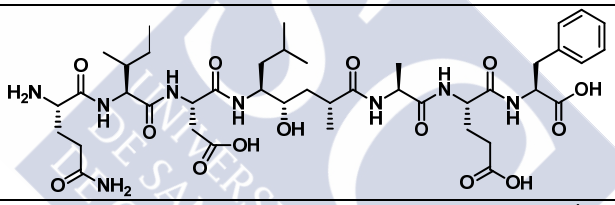
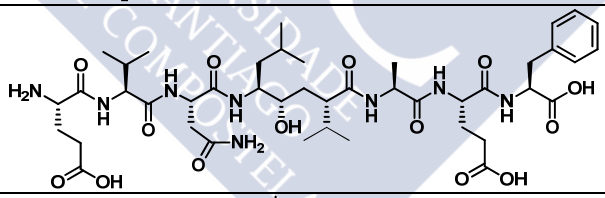
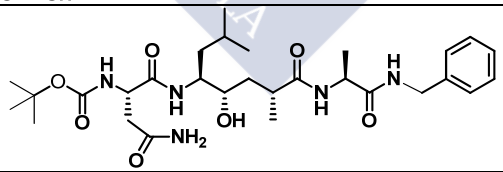
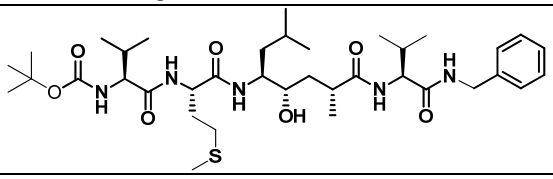
Donde ΔGbind(0) y ΔGbind(-1) son los valores de función de evaluación cuando el residuo ácido está protonado o cargado, respectivamente. X_1 es la fracción de protonación del residuo específico a un pH dado, obtenido de su valor de pK_a mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Todos los cálculos de ME, DM, y sus análisis se llevaron a cabo con el software CHARMM[97] en el superordernador Finisterrae del Centro de Supercomputacion de Galicia (CESGA).

3.2.1.3.- Protocolo de estudio de inhibidores con isósteros tipo hidroxietileno.

En el caso de los inhibidores peptídicos con isósteros tipo hidroxietileno (**I-1** e **I-2**), hemos observado en nuestros resultados que bajo ciertas condiciones puede darse un estado diprotonado de la díada aspártica catalítica, como veremos en los próximos apartados. Para estudiar en mayor profundidad estos resultados, se eligieron una serie de compuestos que presentan este tipo de inhibidor. Además de los compuestos **I-1** e **I-2**, se estudiaron los compuestos descritos en la Tabla 3.2. Los compuestos **I-7** e **I-8** fueron sintetizados mediante un protocolo de síntesis de péptidos en estado sólido en el Serveis Cientificotecnic de la Universitat de Barcelona, tras obtener el isóstero utilizando una nuevo aproximación sintética.[82] Los análisis de FRET para estos compuestos **I-1**, **I-7** e **I-8** se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Marián Castro del Departamento de Farmacología de la USC empleando un kit disponible comercialmente. Los datos de K_i para los compuestos **I-1**, **I-9** e **I-10** se obtuvieron de la bibliografía.[98]

Tabla 3.2. Compuestos adicionales con isóstero hidroxietileno estudiados.

Nombre	Estructura
I-7	
I-8	
I-9	
I-10	

Dado que en el momento de llevar a cabo estos estudios no se disponía de estructuras cristalográficas de complejos enzima-inhibidor para los compuestos **I-7** a **I-10**, éstas se

97. B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217

98. A.K. Ghosh, G. Bilcer, C. Hardwood, R. Kawahama, D. Shin, K.A. Hussain, L. Hong, J.A. Loy, C. Nguyen, G. Koelsch, J. Ermolieff, J. Tang. *J. Med. Chem.* **2001**, *44,* 2865-2868

obtuvieron mediante un protocolo de aproximación por analogía estructural con el complejo 1FKN (que contiene el ligando OM99-2, o **I-1**), que consistió en una superimposición guiada por similitud estructural de los ligandos en el sitio activo. En el caso de **I-10**, compuesto que presenta mayor disparidad estructural con el modelo, se llevó a cabo además una dinámica molecular restringida para reducir la probabilidad de colisiones estéricas y otros artefactos de cálculo.

A la hora de determinar los valores de pK_a de los residuos ácidos del complejo y las curvas de titulación de los residuos de la díada aspártica catalítica para estos complejos obtenidos por homología, seguimos el protocolo basado en CPIRpK descrito en el apartado anterior.

3.2.2.- Resultados y discusión.

En la Figura 3.3 se muestran los datos de interacción de los inhibidores elegidos con BACE-1, observada en los experimentos de SPR a pH 4.5 y 7.4. En dicha figura se aprecian diferencias significativas en las interacciones proteína-ligando a ambas condiciones de pH. Los compuestos **I-3**, **I-4** e **I-5** interaccionaron de manera reversible con la enzima a ambos valores de pH estudiados. También se pueden ver las estimaciones de afinidad asociadas a cada experimento, expresadas como K_D. Dada la lenta velocidad de disociación, no se pudieron valores de K_D para **I-1** o **I-2** a pH 4.5 ni para **I-6** a ninguno de los dos valores de pH. Esta disociación lenta debería tenerse en cuenta al interpretar los datos de inhibición de enzima de estos compuestos ya que los experimentos de inhibición de estado fijo asumen una interacción reversible, que claramente puede no ser el caso para estos inhibidores y pH.

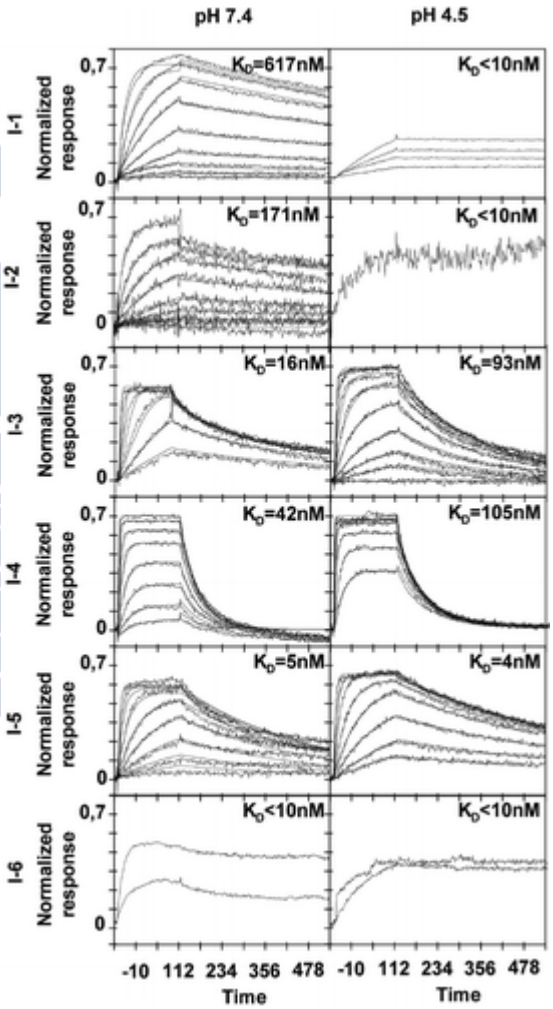


Figura 3.3. Datos de SPR de la interacción de los inhibidores **I-1** a **I-6** con BACE-1. Para aquellas interacciones donde no se pudo estimar la afinidad, se da un límite superior.

La Figura 3.4 muestra las curvas de titulación de los residuos aspárticos de la díada catalítica en función del pH para los complejos de BACE-1 con los inhibidores **I-1** a **I-5**, calculadas mediante CPIRpK, como se ha explicado anteriormente. Específicamente, presenta la fracción de protonacción de cada uno de los residuos de la díada catalítica a diferentes valores de pH. El aspecto más común en los resultados es que Asp32 permanece protonado en un intervalo mayor de pH que Asp228 en la díada catalítica. La estructura

química del inhibidor aparenta tener una gran influencia en la forma de las curvas de titulación y específicamente en la fracción de protonación en los valores de pH del estudio (pH 4.5 y pH 7.4). En el caso de inhibidores con un grupo hidroxietileno en el isóstero (**I-1**, **I-2**), ambos ácidos aspárticos catalíticos permanecen protonados hasta pH 6 o más, lo que supone un valor de pK_a muy diferente al de un ácido aspártico en disolución (3.9), por lo que observamos una díada doblemente protonada a pH 4.5 y mayoritariamente monoprotonada a pH 7.4. Por otro lado, nuestros cálculos predicen que la presencia de un grupo amino interactuando con uno (**I-3**, **I-5**) o ambos (**I-4**) ácidos aspárticos de la díada reducen su pK_a a valores más próximos al del residuo en disolución, particularmente en el caso de Asp228. La diferencia entre los inhibidores con un isóstero tipo hidroxietileno y aquellos que contienen un grupo amina es que ésta permanece cargada dentro del sitio activo en el intervalo de pH del experimento, lo que genera un entorno más polar para la díada catalítica, que a su vez resulta en un pK_a más ácido para la misma. Por ello, a pH 4.5, la díada catalítica se encuentra monoprotonada para estos tres inhibidores. A pH 7.4, la díada se encuentra monoporotonada en el caso de **I-3** e **I-5**, doblemente cargada en el caso de **I-4**.

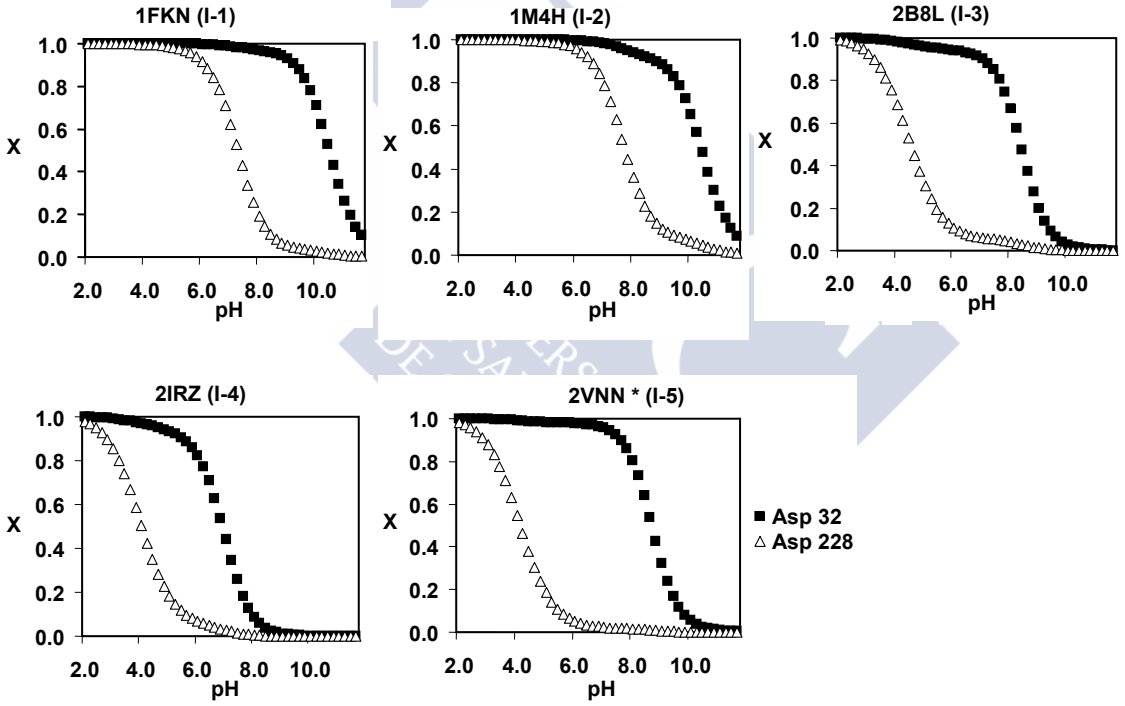


Figura 3.4. Curvas de titulación para el sitio activo de la díada aspártica catalítica en BACE-1. Las curvas muestran la fracción protonada (X) en función del pH para Asp32 y Asp228 en los complejos indicados.

Los resultados de nuestros cálculos para el estado de protonación observado en la díada para los casos de **I-1** e **I-2** a pH 4,5 difieren del consenso construido a través de observaciones experimentales de otras aspartil proteasas (HIV-1 PR,[99] endiotiapepsina[100] y similares) y de los cálculos realizados por otros grupos en el complejo BACE-1/OM99-2.[73,77,78] Estos otros estudios computacionales se mostraban de acuerdo en que la díada está monoprotonada, pero sin

99. S. Piana, D. Sebastiani, P. Carloni. M. Parrinello. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8730-8737
100. L. Coates, H.F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, J. Cooper. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130,* 7235-7237

ponerse de acuerdo en qué residuo aspártico es portador del protón. En nuestro caso, estos complejos muestran un estado diprotonado a los valores más ácidos de pH (4.5), mostrándose de acuerdo con el consenso del estado monoprotonado al pH más básico, pH 7.4, pH al que se obtuvo la estructura cristalográfica. Analizaremos esta discrepancia en detalle más adelante.

La mayoría de cálculos orientados al estudio del estado de protonación del sitio activo de BACE-1 no han tenido en cuenta el efecto del pH.[73,77,78] El objetivo del único estudio relacionado con el pH era dilucidar el estado de protonación de la díada catalítica y aplicarlo a la evaluación *in silico* de una gran cantidad de compuestos de elevada diversidad química.[80] El nuestro es el primer estudio en el que se ha llevado a cabo el cálculo del estado de protonación de otros residuos ionizables. Para la mayoría de proteínas esto no sería un problema ya que los residuos cargados suelen accesibles al disolvente, y por tanto permanecen cargados en el intervalo de pH de interés. La familia de las aspartil proteasas (de la que, como habíamos indicado, BACE-1 es miembro) es una excepción en este ámbito, ya que poseen una cantidad sustancial de residuos ionizables parcial o totalmente enterrados en el interior de la proteína. Por este motivo, sus valores de pK_a podrían ser sensiblemente superiores a los de los modelos libres en disolución, en función del grado de polaridad del microentorno en el que estos residuos se encuentren enterrados.

En la Tabla 3.3 se indican los valores de pK_a calculado para los residuos ácidos de los distintos complejos. Estos resultados muestran que la díada catalítica se ve afectada más drásticamente por su microentorno. Los residuos ácidos que experimentan un aumento de su valor de pK_a suelen ser residuos de Glu, mientras algunos de los residuos de Asp muestran un valor de pK_a más bajo que el valor del residuo libre en disolución.

Un estudio más detallado de la estructura del complejo 1FKN muestra que los residuos de ácido aspártico están enterrados en bolsillos polares, donde pueden formar pares iónicos con residuos básicos, lo que explica su bajo pK_a. La mayoría de los residuos listados poseen un pK_a comprendido entre 4.5 y 7.4, por lo que experimentan un cambio de estado de protonación al cambiar el pH del entorno de ácido a neutro, lo que a su vez redunda en cambios de eficiencia catalítica y afinidad de ligando. La Figura 3.5 ilustra los estados de carga de los residuos ionizables de BACE-1 a pH 4.5 y 7.4 cuando ésta se encuentra complejada con OM99-2 (**I-1**).

Para evaluar el efecto del pH en las afinidades de enlace de ligando, empezamos por la estructura del complejo en la que los residuos ionogénicos se encuentran en su estado de protonación prevalente, según la predicción del grado de protonación calculado para ambos valores de pH en los que se centra nuestro estudio (pH 4.5 y pH 7.4). En algunos casos, el valor de la fracción de protonación calculada de alguno de los residuos a un pH dado es muy cercano a 0.5 (como es el caso del Asp228 a pH 4.5 para el complejo 2B8L), lo que nos indica la existencia de una población significativa del estado minoritario de protonación. Para tener en cuenta el efecto que la población minoritaria puede ocasionar, evaluamos también su contribución como se indica en la sección de materiales y métodos. En estos casos la predicción final de afinidad del inhibidor se calculó mediante la ponderación de los complejos BACE-1/inhibidor en ambos estados de protonación, tomando las fracciones de protonación relevantes para dicha ponderación.

Tabla 3.3. Valores de pK_a para residuos ácidos enterrados de BACE-1.

Residuo[a]	PDB Id (Nombre del Inhibidor)				
	1FKN (I-1)	1M4H (I-2)	2B8L (I-3)	2IRZ (I-4)	2VNN[b](I-5)
Asp 32	10.46	10.35	8.35	6.88	8.67
Asp 83	4.49	4.74	4.79	4.87	4.83
Asp 138	2.98	3.11	3.23	3.38	3.41
Asp 228	7.26	7.68	4.47	4.01	4.11
Asp 311	3.04	3.53	3.88	3.59	3.62
Asp 346	4.46	4.46	4.55	4.59	4.49
Asp 363	3.34	3.25	3.08	3.06	3.24
Glu 116	5.66	6.07	5.95	6.09	5.80
Glu 200	5.95	5.63	5.50	5.52	5.43
Glu 207	4.79	4.67	5.02	5.02	4.60
Glu 219	4.40	4.38	4.06	4.61	4.57
Glu 339	6.72	6.73	6.10	6.26	6.44

[a] Los valores de pK_a para Asp y Glu en disolución son 3.9 y 4.2, respectivamente. [b] Análago de 2VNN.

La Tabla 3.4 muestra los valores de la constante de disociación (K_D) obtenidos por nuestros colaboradores en Suecia mediante experimentos de biosensor así como los valores de energías de interacción proteína-ligando calculados por medio de una función de mecánica molecular (ver Eq. 3.1, Página 38), a ambos valores de pH. Estos valores de energía de interacción son el resultado de la media de las 100 conformaciones con los valores de función de evaluación más bajos. Los valores entre paréntesis indican los valores ponderados, donde la fracción de protonación de uno de los residuos de la díada es muy próxima a 0.5.

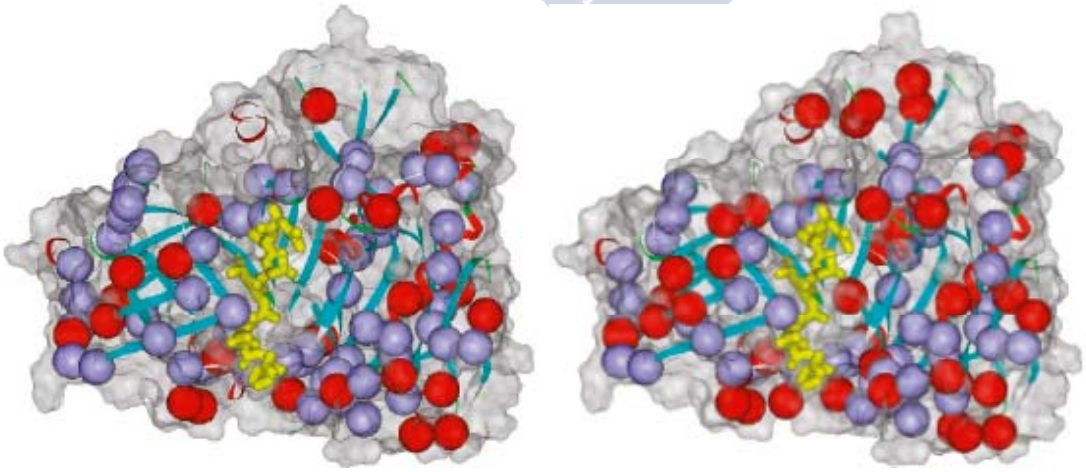


Figura 3.5. Residuos cargados en función del pH para el complejo 1FKN. La ilustración izquierda corresponde a pH 4.5, la derecha a pH 7.4. Los residuos ácidos se representan mediantes esferas rojas y los básicos mediante esferas violeta. El inhibidor se muestra como barras amarillas. El complejo se representa mediante su superficie accesible al disolvente, en gris.

La comparación entre los resultados experimentales y calculados muestra que los segundos reproducen la variación observada de las afinidades con el pH. Por ejemplo, nuestros cálculos muestran como un ligando con un isóstero de tipo hidroxietileno posee su mayor afinidad al valor de pH de mayor actividad catalítica (4.5), de acuerdo con las afinidades experimentales observadas. Esta tendencia es razonable dado que los isósteros de estos inhibidores son análogos del intermedio de reacción de hidrólisis del sustrato y su afinidad de enlace en función del pH debería imitar la dependencia del pH del enlace de sustrato.[101] Cuando el motivo de anclaje a la díada aspártica es un grupo amino, esta tendencia se invierte, y se observa una mayor afinidad al pH al que se obtuvo la estructura cristalográfica (7.4), lo que de nuevo concuerda con el valor experimental. El motivo de este comportamiento puede explicarse dada la naturaleza cargada del grupo amino. Como se ha indicado anteriormente, este grupo tiene un pK_a próximo a 10 en disolución, con lo que es muy probable que permanezca cargado en el entorno del sitio activo e induzca ionización en la díada aspártica, formando en consecuencia un enlace salino entre ambos grupos cargados y por tanto mejorando la afinidad del ligando por la proteína a este pH. Los valores de K_D obtenidos para aquellos inhibidores con un grupo de anclaje mixto (hidroxietilamina) muestran un comportamiento mixto, una tendencia reproducida por nuestras simulaciones. Como se puede ver, el compuesto **I-5** muestra valores de K_D prácticamente iguales a ambos valores de pH, mientras el compuesto **I-3** tiene una mayor afinidad por el enzima a valores más altos. En el caso del complejo 2B8L, la dependencia de la función de enlace con el pH se puede explicar en parte con el estado de protonación múltiple de la díada. Asp32 tiene un pK_a de 8.4, con lo que permanece protonado durante todo el intervalo. Sin embargo, el pK_a de Asp228 es ligeramente inferior a 4.5, lo que resulta en una población prácticamente igual de residuo aspártico protonado y desprotonado. Como muestra la Tabla 3.4, el empleo de una predicción ponderada de afinidad, utilizando como pesos las fracciones de protonación de Asp228, permite para este caso una mejor reproducción de los resultados experimentales.

Tabla 3.4. Valores de inhibición a nivel celular y efecto del pH en los valores de afinidad experimentales y calculados.

PDB Id	Inhibidor	IC_{50} celular (nM)[b]	K_D (nM) [c]		Función de evaluación (kcal/mol)[d]	
			pH 4.5	pH 7.4	pH 4.5	pH 7.4
1FKN	**OM99-2 (I-1)**	940	< 10	617±2.8	-65.0±3.4	-57.2±3.1 (-55.0±3.3)
1M4H	**OM00-3 (I-2)**	N/A	< 10	171±19	-71.4±2.8	-53.0±3.4 (-53.1±3.3)
2B8L	**I-3**	22	93±17	16±3	-59.8±3.3 (-58.4±3.3)	-61.0±3.0
2IRZ	**I-4**	86	105±34	42±20	-45.8±3.8	-53.2±2.4
2VNN[a]	**I-5**	3	4±0.3	5±0.8	-45.2±3.6	-45.5±3.9
2VKM	**I-6**	0.1	< 10	< 10	N/A	N/A

[a]Análogo 2VNN. [b]Inhibición de producción de Aβ en células que expresan el mutante sueco de APP. [c]Desviaciones estándar basadas en al menos dos experimentos independientes. [d]Valores entre paréntesis calculados por ponderación de afinidad de estados de protonación con valores próximos a 0.5.

101. R.T. Turner, G. Koelsch III, L. Hong, P. Castanheira, A. Ghosh, J. Tang. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10001-10006

Además, el orden de afinidad para estos inhibidores (con la excepción de **I-5**) reproduce adecuadamente los resultados experimentales a pH bajo. Así, nuestra función de evaluación predice que los inhibidores análogos del intermedio de reacción (**I-1** e **I-2**) son más potentes a pH 4.5 que los inhibidores con hidroxietilamina o amina como isósteros, de acuerdo con los valores experimentales de K_D. El lento proceso de disociación de los compuestos **I-1** e **I-2** impidió la estimación de sus afinidades mediante los experimentos basados en interacción con biosensores, con lo que se recurrió a datos de inhibición basados en FRET para determinar que el inhibidor **I-2** es más potente que **I-1**, lo que está de acuerdo con las predicciones de nuestra función de evaluación. Nuestra función de evaluación no reproduce de manera tan fiable las tendencias de afinidad de los complejos a través de los valores de pH más alto.

Como hemos discutido anteriormente, las aspartil proteasas muestran su mayor actividad a pH ácido, por lo que se cree que estas enzimas actúan en compartimentos celulares de pH ácido, como los endosomas. Aún así, BACE-1 se encuentra generalmente en la superficie de la célula, donde el pH es neutro. Además, se ha descubierto recientemente[102] que algunos inhibidores de BACE-1 basados en fragmentos heteroaminocíclicos dan señal de actividad celular por debajo de 10 µM y una afinidad a la enzima en el mismo rango a pH cercano al neutro.

Como se puede ver en la Tabla 3.4, los ensayos celulares llevados a cabo por nuestros colaboradores en Suecia indican que los inhibidores con una elevada afinidad enzimática a valores de pH ácido y neutro (esto es, los que poseen una función hidroxietilamina) también muestran actividad celular elevada. Estos resultados se pueden explicar suponiendo que, aunque la enzima es activa en las vesículas endosomales donde el pH es ácido, sólo aquellos compuestos que también interaccionan con la enzima en la superficie de la célula a pH neutro son cotransportados con la proteína hacia el interior. Por tanto, aquellos compuestos que enlazan con BACE-1 tanto a pH ácido como neutro serían en prinicipio buenos candidatos a inhibidores para una efectividad óptima a nivel celular. Nuestros resultados indican que nuestro protocolo asistido computacionalmente para la evaluación de la dependencia con el pH sería particularmente eficiente para ayudar en el diseño de análogos activos a nivel celular.

Por otra parte, nuestros cálculos indican que para los inhibidores con isóstero tipo hidroxietileno (**I-1** e **I-2**) la díada catalítica se encuentra diporotonada a pH ácido. Para corroborar este dato, hemos llevado a cabo un estudio con varios inhibidores de este tipo.[82] Además de los dos inhibidores mencionados, se estudiaron otros cuatro compuestos con isóstero hidroxietileno, presentados en la Tabla 3.2. La Tabla 3.5 muestra los valores de IC_{50} determinados mediante FRET por nuestros colaboradores en la USC, así como los valores de K_i disponibles en la bibliografía para los compuestos estudiados. Como se puede ver en dicha tabla, la clasificación de estos compuestos en función de su actividad inhibitoria sigue aproximadamente el siguiente orden: **I-2** > **I-1** ≈ **I-10** > **I-7** > **I-8** > **I-9**. La única protonación de la díada que se muestra de acuerdo con esta clasificación es aquella en la que se presentan ambos ácidos aspárticos en su valor neutro.

102. S.J. Satchel, C.A. Coburn, D. Rush, K.L.G. Jones, H. Zhu, H. Rajapakse, S.L. Graham, A. Simon, M.K. Holloway, T.J. Allison, S.K. Munshi, A.S. Espeseth, P. Zuck, D. Colussi. A. Wolfe, B.L. Pietrak, M.T. Lai, J.P. Vacca. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2977-2980

Hemos propuesto una explicación para estos resultados basada en la existencia de un enlace de hidrógeno de baja barrera (LBHB), entre un grupo hidroxilo localizado en el isóstero del inhibidor y el oxígeno de uno de los carboxilatos de la díada catalítica. Una de las características definitorias de los LBHB es la existencia de un enlace de hidrógeno muy corto entre dador y aceptor.[103] Algunas de las estructuras cristalográficas de complejos de HIV-1 PR más tempranas ya mostraban que la distancia entre el oxígeno del hidroxilo del inhibidor y uno de los oxígenos de la cadena lateral de la díada aspártica podía llegar a los 2.2 Å,[104] lo que incrementa la posibilidad de un LBHB entre estos átomos.

Tabla 3.5. Inhibidores con isóstero hidroxietilo. Valores de actividad inhibitoria experimental y de evaluación calculados en función de la protonación de la díada.

Nombre	Actividad inhibitoria (nM)		Valores de afinidad calculados según el estado de protonación de la díada[a]			
	IC_{50}	K_i	AspH32/ AspH228[b]	AspH32/ Asp(-)228[b]	Asp(-)32/ AspH228[b]	AspH32/ Asp(-)228[c]
I-1	19.1[d]	1.6[e]	-95.5±2.1	-89.2±1.7	-91.8±2.8	-80.9±1.0
I-2	--	0.3[f]	-99.1±1.5	-91.6±2.0	-84.8±1.7	-77.7±1.5
I-7	45.5[d]	--	-95.7±1.4	-98.0±2.0	-90.1±2.3	-98.4±2.6
I-8	164.5[d]	--	-95.2±1.2	-97.0±2.6	-101.9±2.4	-93.9±2.8
I-9	--	22430[e]	-75.0±1.4	-76.6±2.0	-76.8±2.0	-77.0±2.1
I-10	--	2.5[e]	-96.2±2.2	-94.6±1.7	-95.7±1.1	-91.4±2.0

[a] Energía en kcal/mol. [b] La carga de los residuos ionizables de la proteína, a excepción de la díada catalítica se ha calculado según el protocolo descrito en el apartado 3.2.1.2, para pH 4.5. [c] Todos los residuos ionizables, salvo los de la díada catalítica, se encuentran en el estado de carga correspondiente a sus valores de pK_a en disolución a pH 7. [d] Valores obtenidos como se indica en el apartado 3.1.2.3. y ref. 82. [e] Valores obtenidos de ref. 98. [f] Valores obtenidos de ref. 101.

La existencia de enlaces de hidrógeno compactos, que apoyan los LBHB, se ha confirmado por difracción de rayos X y neutrones de aspartil proteasas ligadas a inhibidores, como la endotiapepsina[105] y BACE-1 enlazadas a inhibidores peptídicos,[25] lo que de nuevo sugiere que los LBHB pueden ser frecuentes en las aspartilproteasas. Como muestra la Figura 3.6, podríamos establecer que el efecto túnel propio de los LBHB puebla el estado diprotonado de la díada, con lo que este estado es un compromiso a la hora de representar en los cálculos de MM la carga difusa de las entidades implicadas en el LBHB.

3.2.3.- Conclusiones de los estudios sobre BACE-1.

Hemos estudiado los efectos del pH en la afinidad de enlace de un grupo de inhibidores de BACE-1 con elevada variedad estructural mediante SPR, y hemos analizado los resultados con la ayuda de cálculos de química computacional. La sinergia entre ambas aproximaciones permite aclarar los resultados del efecto del pH en las afinidades de enlace en base a los procesos de reconocimiento a nivel molecular que subyacen en estos resultados. Hasta donde

103. P.A. Frey, S.A. Whitt, J.B. Tobin, *Science* **1994**, *264.* 1927-1930
104. P.M.D. Fitzgerald, B.M. McKeever, J.F. VanMiddlesworth, J.P. Springer, J.C. Heimbach, C.T. Leu, W.K. Herber, R.A.F. Dixon, P.L. Darke. *J. Biol. Chem* **1990**, *265*, 14209-14219
105. L. Coates, P.T. Erskine, S. Mall, R. Gill, S.P. Wood, D.A.A. Myles, J. Cooper. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 559-566.

sabemos, esta es una de las escasas ocasiones en la que ha estudiado la dependencia de la afinidad del ligando con el pH y su efecto en estado de carga de los residuos de la enzima.[106]

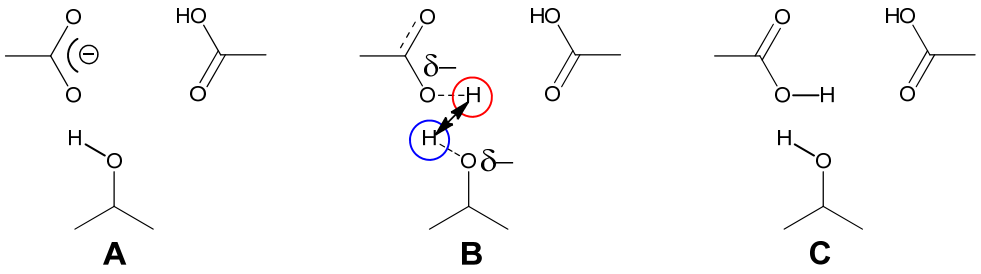


Figura 3.6. (A) y (C) representan dos de los tres posibles estados de protonación de la díada aspártica (mono- y diprotonado, respectivamente). (B) es una representación esquemática de un LBHB con las posibles posiciones del protón rodeadas por círculos.

Nuestros cálculos reproducen el ranking de afinidades a los dos valores de pH estudiados y la mayoría de las tendencias de afinidad de enlace de los inhibidores a pH bajo. Esta correspondencia entre los valores experimentales y calculados del ranking de afinidades respalda la validez de los pK_a asignados por nuestro protocolo de predicción, indicando que los cálculos de pK_a mediante la aproximación de Poisson-Boltzmann están a la altura de protocolos más costosos.

La dependencia de la afinidad de enlace con el pH se puede explicar mediante el estado de protonación de los residuos titulables en el rango de pH estudiado. Los resultados indican que los valores de pK_a de los residuos titulables, particularmente los más próximos al inhibidor, dependen en gran medida de la naturaleza del ligando implicado, lo que discrepa con resultados anteriores.[80,74] Los inhibidores con un isóstero con una función hidroxietileno (OM99-2 y OM00-3) inducen un estado doblemente protonado a pH ácido (4.5), y un estado monoprotonado a pH neutro (7.4). Otros isósteros, que incluyen un motivo amina en su enlace con la díada catalítica, reducen el pK_a de la díada catalítica, generando estados monoprotonados o completamente cargados a ambos estados de pH. En algunos casos, la díada aspártica puede estar poblada por dos estados alternativos de protonación, ambos necesarios para obtener resultados calculados en línea con los experimentales.

Para el caso de los inhibidores con isóstero de tipo hidroxietileno, se corrobora que las simulaciones que emplean un estado diprotonado a pH 4.5 reproducen mejor el orden experimental de energías de inhibición, en comparación con los resultados obtenidos para las simulaciones con protonaciones alternativas de la díada. Hemos presentado la posibilidad de que esto se deba a un posible enlace de hidrógeno de baja barrera.

Nuestros resultados sugieren que para llevar a cabo una búsqueda *in silico* de ligandos no es aconsejable realizar un cribado con un único estado de protonación de la enzima. Los ligandos deberían ser clasificados de acuerdo con el estado de protonación que inducen en la díada catalítica, antes de llevar a cabo un cribado de alto rendimiento asistido por ordenador con un conjunto de dianas que difieren en el estado de protonación.

106. M. Fornabaio, P. Cozzini, A. Mozzarelli, D.J. Abraham, G.E. Kellog. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4487-4500

Como hemos indicado anteriormente, BACE-1 se desplaza desde la superficie de la membrana - donde el pH es neutro - hacia la región endosomal de la célula - donde el pH es ácido - para llevar a cabo su actividad catalítica. Hemos demostrado que la actividad del inhibidor a nivel celular puede estar relacionada con una potencia inhibitoria elevada del ligando a ambos valores de pH indicados.

3.3.- ESTUDIOS EN HIV-1 PR.

Para el estudio de la influencia de la naturaleza del inhibidor en el estado de protonación de HIV-1 PR, decidimos utilizar el conjunto de inhibidores presentados en la Figura 3.7. Este grupo incluye una variedad de motivos químicos que van desde los inhibidores peptídicos empleados en los primeros pasos de la búsqueda de cabezas de serie hasta aquellos que se emplean actualmente en el tratamiento farmacológico del SIDA.

3.3.1.- Metodología.

3.3.1.1.- Análisis de interacción con el biosensor SPR.

Para examinar el efecto del pH en la afinidad de enlace nuestros colaboradores en Suecia han determinado la afinidad de varios inhibidores a tres valores de pH (4.1, 5.1, y 7.4). Se empleó un biosensor SPR (Biacore S51, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para los estudios de interacción, siguiendo la metodología descrita en la bibliografía.[83] Se registraron las señales de enlace como unidades de resonancia (RU), para posteriormente presentarlas en función del tiempo en sensogramas. Se empleó el software BIAevaluation y S51 Biacore para extraer la información de los sensogramas. Los sensogramas normalizados se ajustaron a un modelo de interacción Langmuir 1:1[86] condicionado al transporte limitado de masa como series de seis concentraciones diferentes de inhibidor.

3.3.1.2.- Preparación de modelos, estudios de pK_a y predicción de afinidades.

Descargamos las estructuras experimentales de los complejos inhibidor-enzima estudiados del Protein Data Bank (PDB ids. 1EBW, 1EBY,[107] 5HVP,[104] 1SDV,[108] 2NMW[109] y 3EKX[110]), a las que añadimos los hidrógenos y asignamos los tipos atómicos y cargas según el campo de fuerzas CHARMM.[96] Dado que no se conoce la estructura del complejo entre HIV-1 PR y el inhibidor A008, modelamos el correspondiente complejo mediante analogía con el complejo 1AJX,[111]

107. H.O. Andersson, K. Fridborg. S. Löwgren, M. Alteman, A. Mühlman, M. Björsne, N. Garg. L. Kvarnström, W. Schaal; B. Classon, A. Karlén, U.H. Danielsson, G. Ahlsén, U. Nillroth, L. Vrang, B. Öberg, B. Samuelsson, A. Hallberg. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1746-1758
108. B. Mahalingam, Y.F. Wang, P.I. Boross, J. Tozser, J.M. Louis, R.W. Harrison. I.T. Weber. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271,* 1516-1524
109. Y. Tie, A.Y. Kovalevsky, P. Boross. Y.F. Wang, A.K. Ghosh, J. Tozser, R.W. Harrison, I.T. Weber, *Proteins* **2007**, *67*, 232-242
110. N.M. King, M. Prabu-Jeyabalan, R.M. Bandaranayake, M.N.L. Nalam, E.A. Nalivaika, A. Özen, T. Haliloglu, N.K. Yilmaz, C.A. Schiffer. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7,* 1536-1546
111. K. Bäckbro, S. Löwgren, K. Österlund, J. Atepo, T. Unge, J. Hultén, n.M. Bonham, W. Schaal, A. karlén, A. Hallberg. *J. Med. Chem.* **1997,** *40,* 898-902

donde sustituimos los grupos bencilo del ligando presente por 4-hidroximetilbencilo, ajustando las cadenas laterales para evitar colisiones estéricas.

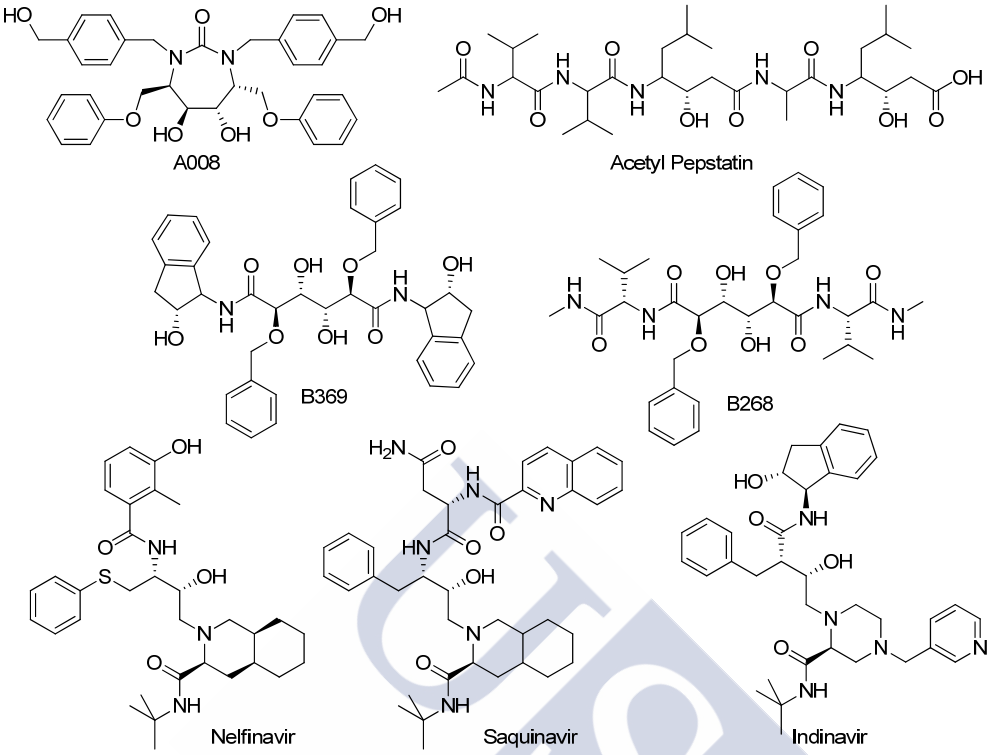


Figura 3.7. Inhibidores de HIV-1 PR estudiados.

Hemos calculado los valores de pK_a de todos los residuos ionizables de los complejos mediante el protocolo de CPIRpK propuesto por Spassov y Yan.[88] Como en el caso de BACE-1, este protocolo nos permitió determinar de manera iterativa el pK_a de residuos que interactúan entre sí empleando una aproximación de tipo Generalized Born para reproducir los efectos del disolvente. Los valores de constante diélectrica interna y externa empleados en estos cálculos fueron 10 y 80 respectivamente, con una fuerza iónica de 0.145 y un cutoff de la energía de clústering de 0.5 kcal/mol. Empleamos este protocolo para todos los residuos de la proteína y aquellos residuos de aminoácido estándar que formen parte del inhibidor. En los casos en los que el inhibidor presenta otros grupos ionizables (los grupos amino de nelfinavir, indinavir, y saquinavir, así como el carboxilato del grupo estatina de la acetilpepstatina), evaluamos los valores de pK_a para ambos estados de carga del inhibidor. Dado que el módulo CPIRpK no permite evaluar el pK_a de los grupos ionizables de los inhibidores, hemos empleado los valores de pK_a en disolución calculados por el módulo Epik,[112] implementado en la suite de programas Schrödinger.[113]

Para nuestros cálculos de afinidad elegimos los estados de protonación predichos como prevalentes a pH 4.1, 5.1 y 7.4 en función de la fracción de protonación calculada para cada residuo derivada del pK_a estimado según la herramienta de CPIRpK. En aquellos casos en los

112. J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, M. Uchimaya. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2007,** *21*, 681-691
113. Epik v. 2.2, Schrödinger, *LLC New York, NY,* **2011**

que el valor de pH era muy próximo al valor de pK_a de un residuo ácido de HIV-1 PR, preparamos estructuras adicionales con el estado de protonación alternativo para la evaluación de afinidad con nuestra función de MM. Dada la elevada cantidad de estructuras a estudiar, decidimos emplear un método simplificado de análisis, basado en un protocolo de mecánica molecular compuesto de múltiples etapas de minimización de energías (ME). Este protocolo incorpora dos cálculos de ME dedicados a optimizar la posición de los protones y la red de enlaces de hidrógeno entre ligando y proteína observada en la estructura cristalográfica. En la primera ME restringimos el movimiento de todos los átomos pesados, mientras que en la segunda asignamos restricciones elásticas de tipo NOE a los átomos pesados que actúan como dadores/aceptores en los enlaces de hidrógeno entre el ligando y la proteína. Cada una de las ME se compone de dos segmentos: Un primer tramo de 2000 pasos empleando un protocolo de tipo Steepest Descent, seguido de una segunda etapa de 50000 pasos donde se emplea un protocolo de optimización tipo ABNR. El gradiente de tolerancia en estos cálculos fue de 0.001 kcal/mol Å^2. Para todos los cálculos de ME empleadmos un modelo de solvatación implícita basado en la aproximación Generalized Born con switching sencillo (GBSW),[87] con una constante dieléctrica del interior de la proteína de 5. Empleamos este valor para tener en cuenta de manera implícita la flexibilidad de la proteína.[79] Para cada una de las estructuras optimizadas obtuvimos el valor de afinidad mediante el empleo de la función de evaluación (1) descrita para los cálculos de BACE-1, que reproducimos de nuevo a continuación:

$$<\Delta Gbind> = <\Delta Gmm(P:L) - \Delta Gmm(P) - \Delta Gmm(L) + \Delta Ggb(P:L) - \Delta Ggb(P) - \Delta Ggb(L)> \quad (3.1)$$

donde ΔGmm y ΔGgb indican los componentes de mecánica molecular del campo de fuerzas CHARMM y la solvatación GBSW, respectivamente, para el complejo ligando-proteína (P:L), proteína (P), y ligando (L). Al igual que en el caso de BACE-1, llevamos a cabo todos los cálculos en el superodernador Finisterrae disponible en el Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). Como se ha indicado anteriormente, existe la posibilidad de que ambos estados de protonación de un residuo acídico dado estén altamente poblados. Para estos casos, obtuvimos la función de evaluación final (2) mediante la ponderación del valor de energía de interacción para ambos estados de protonación, como hemos explicado en el apartado 3.2.1.2.

$$\Delta Gbind = X_1\, \Delta Gbind(0) + (1-X_1)\, \Delta Gbind(-1) \quad (3.2)$$

Donde ΔGbind(0) y ΔGbind(-1) son los valores de función de evaluación cuando el resudio ácido está protonado o cargado, respectivamente. X_1 es la fracción de protonación del residuo específico a un pH dado, obtenido de su valor de pK_a mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La constante dieléctrica tiene un efecto notable en los valores de pK_a calculados para los grupos ionizables.[78] Para evaluar el efecto de este parámetro en nuestros resultados, reevaluamos los valores de pK_a de los residuos ionizables para algunos de los complejos estudiados a varios valores de constante dieléctrica, desde el valor estándar de 10 hasta un valor final de 20. Una vez estimamos los nuevos valores de carga de los complejos, obtuvimos de nuevo los valores de afinidad de enlace siguiendo los protocolos descritos anteriormente con el valor incrementado de constante dieléctrica.

3.3.2.- Resultados y discusión.

En primer lugar, decidimos validar nuestro protocolo de predicción de pK_a, empleando como referencia para ello el complejo de la proteína HIV-1 PR con el inhibidor simétrico de tipo urea cíclica DMP323 (cuya estructura se ilustra en la Figura 3.8), sobre el que se ha realizado uno de los estudios de RMN más extensivos para la determinación de pK_a de los residuos ionizables del complejo.[114]

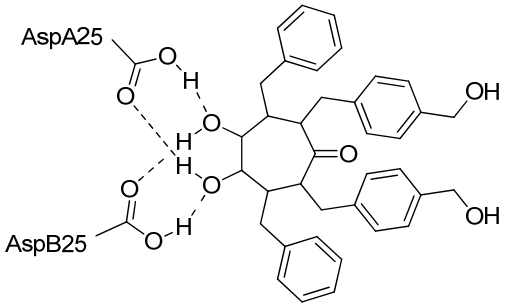


Figura 3.8. Red de enlaces de hidrógeno propuesta entre las cadenas laterales de AspA25/B25 y el grupo diol de DMP323.

Para ello, hemos calculado los valores de pK_a de los residuos ácidos de este complejo. Como se puede ver en la Tabla 3.6, nuestro protocolo computacional reproduce de manera adecuada los resultados experimentales. Por ejemplo, nuestro protocolo predice el desplazamiento hacia valores más elevados del pK_a de los residuos AspA25/B25 de la díada catalítica en comparación con los resultados del residuo libre en disolución, de acuerdo con valores experimentales. [114] De igual manera, nuestros cálculos indican que los residuos Asp A29/B29 se vuelven más ácidos que el modelo en disolución, lo que de nuevo está en línea con los valores experimentales.

Tabla 3.6. Comparación de los valores de pK_a experimentales y calculados para las cadenas laterales ácidas de HIV-1 PR enlazada a DMP 323.

Residuo	Calculado	Experimental		Residuo	Calculado	Experimental	
	pK_a	pK_a [a]	pK_a [b]		pK_a	pK_a [a]	pK_a [b]
Asp A25	8.24	8.19	7.70	Glu A21	4.28	4.52	4.48
Asp A29	2.66	2.06	1.97	Glu A34	4.71	4.88	4.91
Asp A30	4.04	3.99	3.96	Glu A35	4.27	3.73	3.75
Asp A60	3.55	3.11	3.15	Glu A65	4.00	3.74	3.72
Asp B25	7.21	8.19	7.70	Glu B21	4.23	4.52	4.48
Asp B29	2.63	2.03	1.97	Glu B34	5.26	4.88	4.91
Asp B30	4.08	3.99	3.96	Glu B35	3.86	3.73	3.75
Asp B60	3.50	3.11	3.15	Glu B65	4.03	3.74	3.72

[a] Este conjunto de valores experimentales se ha determinado mediante desplazamientos químicos de carbono carboxílico en función del pD. [b] Este conjunto de valores experimentales se ha determinado mediante desplazamientos químicos de carbono alifático en función del pD.

114. T. Yamazaki, L.K. Nicholson, D.A. Torchia, P. Wingfield, S.J. Stahl, J.D. Kaufman, C.J. Eyermann, C.N. Hodge, P.Y.S. Lam, Y. Ru, P.K. Jadhav, C.H. Chang, P.C. Weber. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116,* 10791-10792

Una vez validado nuestro protocolo, nos centramos en determinar el papel del pH en la inhibición de HIV-1 PR, mediante el estudio comparativo de nuestros resultados teóricos y los resultados experimentales obtenidos por nuestros colaboradores en Suecia.

La Tabla 3.7 muestra los valores calculados de pK_a para los residuos ácidos de la enzima HIV-1 PR, cuando ésta se encuentra enlazada a ligandos neutros. Estos resultados corresponden a los inhibidores estudiados que no poseen fragmentos ionizables (A008, B268 y B369), por lo que los valores de pK_a de los residuos ionizables del complejo pueden calcularse directamente.

Tabla 3.7. Valores de pK_a calculados para residuos ácidos de HIV-1 PR ligados a inhibidores sin grupos ionizables.

Residuo	A008	B268	B369	Residuo	A008	B268	B369
Asp A25	8.64	10.23	10.24	Glu A21	4.41	4.30	4.25
Asp A29	2.77	3.01	3.51	Glu A34	4.82	5.17	5.23
Asp A30	4.78	4.06	4.08	Glu A35	4.18	4.13	4.15
Asp A60	3.66	3.50	3.60	Glu A65	3.73	3.67	3.65
Asp B25	7.25	6.91	6.70	Glu B21	4.46	4.26	4.26
Asp B29	2.49	3.02	3.84	Glu B34	5.01	5.01	4.98
Asp B30	4.12	3.91	3.69	Glu B35	3.79	3.77	3.95
Asp B60	2.77	3.60	3.47	Glu B65	3.87	3.80	3.77

Los otros inhibidores estudiados pueden estar cargados o neutros a un valor dado de pH, dependiendo de su entorno en la enzima. Algunos de ellos (indinavir y saquinavir) poseen más de un grupo ionizable que podría alterar su carga en el intervalo de pH. Por ello, es necesario disponer de una estimación de la probabilidad de la protonación de los fragmentos ionizables de los inhibidores, antes del análisis de pK_a de residuos de la proteína. Para esto hemos llevado a cabo la asignación de cargas a cada pH según el pK_a estimado en Epik.[113] Por ejemplo, indinavir y saquinavir poseen varias aminas susceptibles a protonación para algunos de los valores de pH empleados. Nuestras predicciones de pK_a en disolución indican que en saquinavir, el grupo amino protonado de la quinolina (pK_a < 4.0) es mucho más ácido que el grupo amino protonado de la decahidroquinolina (pK_a ≈ 10); este segundo grupo amina es el único que estará protonado en el intervalo de pH empleado en nuestro trabajo. Por otra parte, nuestras evaluaciones de pK_a de indinavir en disolución indican que el grupo amina con más probabilidades de estar protonado en el intervalo de pH en el que trabajamos es el N de la piperazina más cercano al grupo piridina.

Hemos calculado los valores de pK_a de los residuos ionizables de la enzima cuando está ligada a los inhibidores en ambos estados de protonación, cargados y neutros, para estudiar el efecto de la carga del ligando en el estado de carga de la proteína. Los resultados se muestran en la Tabla 3.8. Dicha tabla muestra cómo el estado de carga de los residuos ionizables de la enzima depende en gran medida del estado de protonación del inhibidor, un efecto particularmente apreciable en el caso de los residuos aspárticos catalíticos.

Como se ha indicado antes, el valor de la constante dieléctrica asignado a la proteína tiene un efecto notable en los valores resultantes de pK_a de sus residuos ionizables. Trylksa y colaboradores[79] ya demostraron que incrementar el valor de la constante diélectrica del

interior de la proteína en la estructura apo y algunas de las estructuras holo de HIV-1 PR puede resultar en una reducción del valor de pK_a de los residuos de la díada catalítica. Por ello, es posible que el incremento de la constante dieléctrica más allá de 5 en los cálculos de pK_a nos permita obetener resultados de HIV-1 PR con una díada monoprotonada, más en línea con los valores de RMN[115] y cristalografía de Rayos X[116] para inhibidores asimétricos.

Tabla 3.8. Valores de pK_a calculados para los residuos ácidos de HIV-1 PR ligado a inhibidores con grupos ionizables.

Residuo	Indinavir		Nelfinavir		Saquinavir		AcetilPepstatina	
	Cargado	Neutro	Cargado	Neutro	Cargado	Neutro	Cargado	Neutro
Asp A25	7.21	7.29	6.15	7.36	5.61	6.56	8.67	8.77
Asp A29	2.19	2.42	2.10	2.23	2.84	2.94	2.79	2.80
Asp A30	3.66	3.76	4.40	4.75	4.29	4.37	4.74	4.75
Asp A60	3.42	3.44	3.09	3.11	3.52	3.53	3.46	3.46
Asp B25	9.41	9.57	8.89	9.85	8.03	8.74	7.30	7.41
Asp B29	3.35	3.51	2.11	2.32	2.31	2.52	2.37	3.30
Asp B30	4.56	4.60	3.94	4.08	4.02	4.15	3.88	5.04
Asp B60	3.36	3.37	3.24	3.25	3.01	3.03	3.69	3.72
Glu A21	4.26	4.29	4.38	4.41	4.62	4.63	4.81	4.83
Glu A34	4.32	4.35	4.98	5.05	5.02	5.41	5.31	5.35
Glu A35	4.23	4.25	3.68	3.71	3.74	3.76	4.14	4.15
Glu A65	3.67	3.67	3.58	3.60	3.54	3.55	4.09	4.09
Glu B21	4.47	4.52	4.53	4.55	4.09	4.12	4.95	4.95
Glu B34	4.72	4.83	5.07	5.11	5.20	5.25	4.85	4.86
Glu B35	3.65	3.68	3.97	4.00	4.23	4.25	3.72	3.74
Glu B65	3.83	3.85	3.56	3.57	3.75	3.76	3.46	3.47

La Tabla 3.9 muestra los valores de pK_a de la díada aspártica catalítica de varios de los complejos estudiados aquí en función del valor de constante dieléctrica. Esta tabla muestra como el incremento de la constante dieléctrica, predeciblemente, reduce los valores de pK_a de los aspárticos catalíticos independientemente de la estructura química del inhibidor.

La Tabla 3.10 lista los valores de K_D obtenidos por SPR por nuestros colaboradores en Suecia a los tres valores de pH para todos los complejos HIV-1 PR/inhibidor estudiados en este capítulo. Los experimentos muestran que los inhibidores de HIV-1 PR se pueden clasificar en tres grupos, de acuerdo con el efecto del pH en su afinidad. El primer grupo contiene a los inhibidores que carecen de grupos ionizables (A008, B268, B369). Sus afinidades son similares a pH 4.1 y 5.1; la similitud entre afinidades no se mantiene a pH 7.4, donde esta afinidad es menor. El segundo grupo lo compone la acetilpepstatina, cuya afinidad se reduce con el incremento de pH. Por último, el tercer grupo de inhibidores (nelfinavir, saquinavir e indinavir) experimentan un efecto similar en sus afinidades en función del pH, con un incremento de

115. Y.X. Wang, D.I. Freedberg, T. Yamazaki, P.T. Wingfield, S.J. Stahl, J.D. Kaufman, Y. Kiso, D.A. Torchia. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9945-9950

116. M. Adachi. T. Ohhara, K. Kurihara, T. Tamada, E. Honjo, N. Okazaki, S. Arai, Y. Shoyama, K. Kimura. H. Matsumura, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, Y. Mori, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, R. Kuroki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009,** *106,* 4641-4646

afinidad al pasar de pH 4.1 a 5.1, pero sin una variación especialmente significativa cuando el pH se vuelve neutro (7.4).

Tabla 3.9. Valores de pK_a calculados para la díada catalítica de HIV-1 PR en función de la constante dieléctrica.

Inhibidor	Residuo	Constante dieléctrica de la proteína [a]			
		10	12	15	18/20
A008	Asp A25	8.64	7.74	6.70	6.47
	Asp B25	7.25	6.66	5.93	4.77
B268	Asp A25	10.23	8.86	7.67	6.87
	Asp B25	6.91	6.2	5.5	5.02
B369	Asp A25	10.24	8.96	7.76	6.53
	Asp B25	6.7	6.01	5.32	4.60
Saquinavir	Asp A25	5.61 (6.56)			4.07 (4.83)
	Asp B25	8.03 (8.74)			5.63 (6.14)

[a] Los números entre paréntesis corresponden a los obtenidos con el inhibidor en estado neutro.

Tabla 3.10. Efecto del pH en los valores de afinidad experimentales y calculados.

Inhibidor	Función de Evaluación de afinidad (kcal/mol) [a]			Valores experimentales de K_D (nM)		
	pH 4.1	pH 5.1	pH 7.4	pH 4.1	pH 5.1	pH 7.4
A008	-79.85 **(-79.98)**	**-80.18**	**-78.85**	1.83	1.84	6.95
B269	**-87.22**	**-87.46**	**-85.50**	2.97	3.00	10.80
B369	-99.93 **(-101.35)**	**-101.42**	**-99.69**	1.14	1.00	13.90
Indinavir	--	--	-100.76 **(-92.82)**	5.45	1.38	1.20
Indinavir (+)	**-88.55**	**-91.96**	-92.82			
Nelfinavir	--	**-91.50**	-90.70 **(-90.80)**	37.6	2.99	3.40
Nelfinavir (+)	**-88.55**	-89.12	-92.80			
Saquinavir	--	**-92.38**	**-96.23**	4.13	0.637	0.577
Saquinavir (+)	**-91.44**	-92.49	-94.89			
AcetilPepstatina	**-95.73**	-88.80	-94.20 (-95.0)	208	759	8150
AcetilPestatina(-)	--	**-92.17**	**-91.84**			

[a] Los resultados en negrita marcan la mejor correspondencia con los valores experimentales. Valores entre paréntesis calculados por ponderación de afinidad de estados de protonación con valores próximos a 0.5.

También hemos listado los valores de la afinidad de enlace calculada para cada inhibidor a los tres valores de pH, lo que nos permite racionalizar el orden de afinidades de enlace según pH basado en el estado de carga de la díada. Como se ve en la Tabla 3.9, el incremento de la constante dieléctrica lleva a díadas aspárticas catalíticas monoprotonadas en el pH óptimo de actividad para la enzima (5) en muchos complejos HIV-1 PR/ligando, de acuerdo con algunos

de los resultados de RMN y difracción de neutrones.[115,116] Por ello, para explorar el efecto de esta variable, calculamos la afinidad de enlace para la distribución de carga a valores más altos de constante dieléctrica. La Tabla 3.11 muestra los valores de afinidad calculados para acetilpepstatina y nelfinavir a constante diélectrica 18. Como se ve en la tabla, la correspondencia con los valores experimentales de estas predicciones son peores que las presentadas en la Tabla 3.10. Este resultado apoya en cierta medida el estado de carga de los residuos ionizables empleado en los cálculos de dicha tabla, a un valor de constante dieléctrica menor.

Tabla 3.11. Valor calculado de la función de evaluación de afinidad de enlace a constante dieléctrica 18 (kcal/mol).

Inhibidor		**Valor de pH**		
		4.1	**5.1**	**7.4**
Nelfinavir	Cargado	-98.81	-97.95	-96.93
	Neutro	-96.73	-96.84	-94.13
AcetilPepstatina	Cargado	-108.59	-108.47	-104.62
	Neutro	-109.02	-104.29	-102.93

Al revisar las Tablas 3.7 (Página 52) y 3.8 observamos que la estructura química y la carga del inhibidor tienen un efecto muy marcado en los valores de pK_a de las cadenas laterales de los residuos ionizables de la proteína. Aún así, se pueden observar algunas características comunes entre las tendencias del pK_a de los residuos de la proteína. Por ejemplo, nuestros cálculos indican que el desplazamiento más grande de pK_a, en comparación con los valores modelo en disolución, corresponde a los residuos ácidos en la región de enlace, particularmente aquellos de la díada catalítica. El pK_a de estos residuos varía en varias unidades con el cambio de inhibidor.

En comparación, los residuos ácidos residentes en los espacios cercanos a la díada catalítica muestran cambios más pequeños, pero aún así notables, como es el caso del descenso del pK_a del AspB30 cuando la proteína está ligada a la acetilpepstatina cargada. Como muestra la Figura 3.9, esta tendencia se puede explicar al explorar la estructura del sitio de enlace, que muestra que este residuo es parte de un microentorno complejo, estableciendo contactos con el carboxilato C-terminal del residuo estatina del inhibidor y con la cadena lateral de LysB45. En su conjunto, los desplazamientos predichos para los residuos ácidos muestran tendencias similares a las observadas en los experimentos para el complejo HIV-1 PR/DMP323. [114]

Por otra parte, la asignación del estado de protonación de la díada aspártica basada en experimentos de RMN de la enzima ligada a pepstatina A[117] difiere de nuestra predicción cuando la enzima está enlazada con Acetilpepstatina. Nuestros resultados indican que la díada aspártica sólo estará monoprotonada al valor de pH de 7.4, mientras que el RMN sugiere una díada monocargada en un intervalo más amplio de pH. Los resultados experimentales que apoyan la estructura monoprotonada se obtuvieron mediante el análisis de ^{13}C-RMN, que muestra dos señales distintivas a 172.4 y 178.8 ppm, las cuales no se alteran en el rango de pH entre 2.5 y 6.5, con lo que indican que el estado de protonación de la díada no cambia en este

117. R: Smith; I.M. Bereton, R.Y. Chai, S.B.H. Kent. *Nat Struct. Biol.* **1996,** *3,* 946-950

rango de pH.[115] Aún así, estos resultados de RMN pueden ser interpretados de más de una manera. Piana y colaboradores[99] propusieron un estado diprotonado de la díada basándose en dinámicas moleculares *ab initio* que incluyen el cálculo de los desplazamientos químicos e isotópicos de ^{13}C. En este trabajo mostraron que el único estado de carga de la díada que reproduce estos valores observados de RMN es el neutro, de acuerdo con nuestras predicciones. Para otros inhibidores, como KNI-272, los resultados de difracción de rayos X de una estructura de alta resolución combinada con estudios de difracción de neutrones[116] muestran la existencia de densidad electrónica próxima únicamente uno de los dos residuos de ácido aspártico de la díada, apoyando así la existencia de un estado monoprotonado.

Los resultados aquí mostrados sugieren que el estado de carga de la díada aspártica catalítica es neutro al valor de pH en el que la enzima es más activa (5-6), ya que sus valores de pK_a están en su mayor parte por encima de 6. Los resultados de las Tablas 3.7 y 3.8 indican que el estado monoprotonado de la díada aspártica catalítica es marcadamente mayoritario sólo a pH 7.4 cuando la enzima se encuentra ligada a B268, B369, nelfinavir y saquinavir. Como muestran las tablas, el complejo en el que la díada se convierte en monoprotonada al pH más bajo (5.6) es en el complejo con saquinavir cuando el ligando está en su estado protonado. Como en el caso de los hidroxietilenos enlazados a BACE-1, se puede encontrar una explicación para estos estados de protonación basada en la existencia de un enlace de hidrógeno de baja barrera (LBHB) entre los ácidos aspárticos catalíticos y el inhibidor, como se ha discutido para BACE-1.

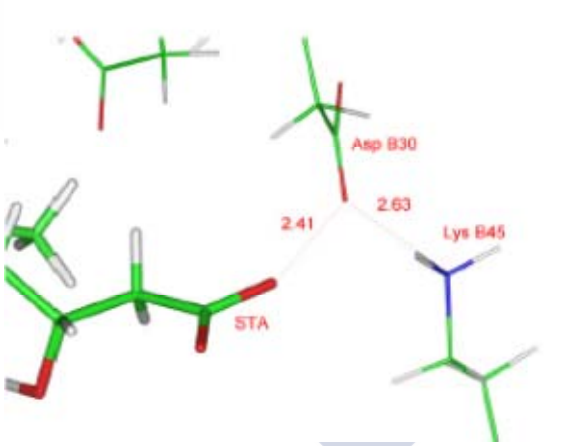


Figura 3.9. Microentorno del residuo Asp B30 en el complejo HIV-1 PR/acetilpepstatina. Distancias en Å

Por último, los resultados de las tablas indican que los estados de protonación de los residuos ionizables de HIV-1 PR dependen en gran medida de la estructura química y estado de ionización de cada inhibidor, de manera similar a nuestros resultados previos en BACE-1, presentados en un apartado anterior de este capítulo.

Como se ha indicado anteriormente, la Tabla 3.10 lista los valores experimentales de afinidad así como los predichos por nuestra función de MM. Hay dos cuestiones clave a la hora de comparar estos dos sets de resultados. El primero responde al hecho de que en algunos casos los valores de pK_a de algunos de los residuos ácidos presentes en el sitio activo de HIV-1 PR están muy próximos a los valores de pH empleados en la evaluación de las afinidades de enlace. En estos casos, la población de estos residuos sería elevada tanto en su forma cargada como neutra. Por ejemplo, cuando HIV-1 PR está enlazada con el inhibidor B369, el valor de

pK_a calculado para AspA30 es 4,08, con lo que las poblaciones de residuo ionizado y protonado son prácticamente idénticas a pH 4.1. Otro ejemplo se ve en la díada aspártica catalítica, donde el valor de pK_a de estos residuos se desplaza en varias unidades hacia valores básicos. En algunos casos (indinavir, nelfinavir), sus valores de pK_a están próximos al pH más alto estudiado (7.4), con lo que también hay niveles significativos de ambos estados de carga para el aspártico A25. Como se ha indicado anteriormente, hemos tenido encuenta estos estados de protonación múltiples mediante la ponderación de los valores de función de evaluación de ambas estructuras. Esta ponderación mejora la correspondencia del orden de afinidad de enlace con el valor experimental en varios casos. Por ejemplo, al considerar los múltiples estados de protonación de Asp A30 se incrementa la afinidad de enlace de B369 por HIV-1 PR a pH 4.1, acercándola a los valores de pH 5.1, de acuerdo con los valores experimentales. Como se puede ver también en la Tabla 3.10, el tener en cuenta los dos estados de protonación del Asp A25 (pK_a =7.3) en el indinavir ayuda a reducir su afinidad de enlace calculada, de nuevo mostrando una mayor correlación con los valores experimentales.

Otro factor de peso en el orden de afinidad de enlace es el estado de protonación del inhibidor. Como se ha mencionado antes, nuestra predicción de pK_a de los grupos ionizables indica que nelfinavir, indinavir y saquinavir poseen un grupo amino protonado con un valor de pK_a por encima de 7 en disolución. Aún así, la revisión del sitio activo en las estructuras de estos complejos muestra que los grupos amino no establecen enlaces de hidrógeno o pares salinos con ningún grupo polar de la proteína. Esto sugiere la posibilidad de que el pK_a de estos grupos amino protonados en el interior del sitio activo sea inferior al pK_a predicho en disolución, lo que nos llevaría a un ligando neutro a valores más bajos de pH del que indicaría dicho pK_a. Para buscar el estado real de protonación del grupo amino en estos inhibidores hemos calculado la energía de enlace para el conjunto de estados de protonación posibles de estos inhibidores, empezando por los predichos por el módulo Epik de Schrödinger.[113] En el caso de nelfinavir, la correlación con los resultados experimentales mejora cuando se neutraliza el grupo amino a valores de pH de 5.1 o superior. Este resultado es coherente con una posible reducción del pK_a cuando nelfinavir se encuentra en el entorno del interior del sitio activo, y proporciona una explicación de la mejora de la afinidad de enlace al aumentar el pH de 4.1 a 5.1. La neutralización del ligando a pH 5.1 genera una molécula más hidrofóbica con un penalizador de desolvatación menor, un resultado que favorece el enlace con la enzima.

El inhibidor acetilpepstatina tiene un grupo carboxilo en su extremo C-terminal. El módulo Epik predice un valor de pK_a en disolución de 4.4 para este grupo, Por ende, si este pK_a se mantiene al ligarse con la proteína, este grupo estaría neutro a pH 4.1 y cargado a valores mayores. Para sondear esta alternativa, hemos calculado los valores de pK_a de la proteína en los dos posibles estados de carga del inhibidor, antes del cálculo de afinidad de enlace según nuestro protocolo de MM. Como se ve en la Tabla 3.10, nuestros resultados concuerdan con las tendencias experimentales, cuando el carboxilato anteriormente mencionado conserva su valor calculado de pK_a de 4.4. Una explicación para este resultado puede encontrarse en el microentorno polar en el que se localiza este grupo (véase Figura 3.9).

En resumen, cuando se consideran los dos factores discutidos anteriormente relativos a los múltiples estados de protonación de residuos de la proteína y los cambios de carga del inhibidor, se observa un elevado grado de correlación en el ranking de afinidad de enlace de

los inhibidores con el incremento de pH entre los resultados experimentales y los valores calculados. Esta correlación se puede apreciar de manera más clara en la Figura 3.10, que representa gráficamente las tendencias observadas y calculadas.

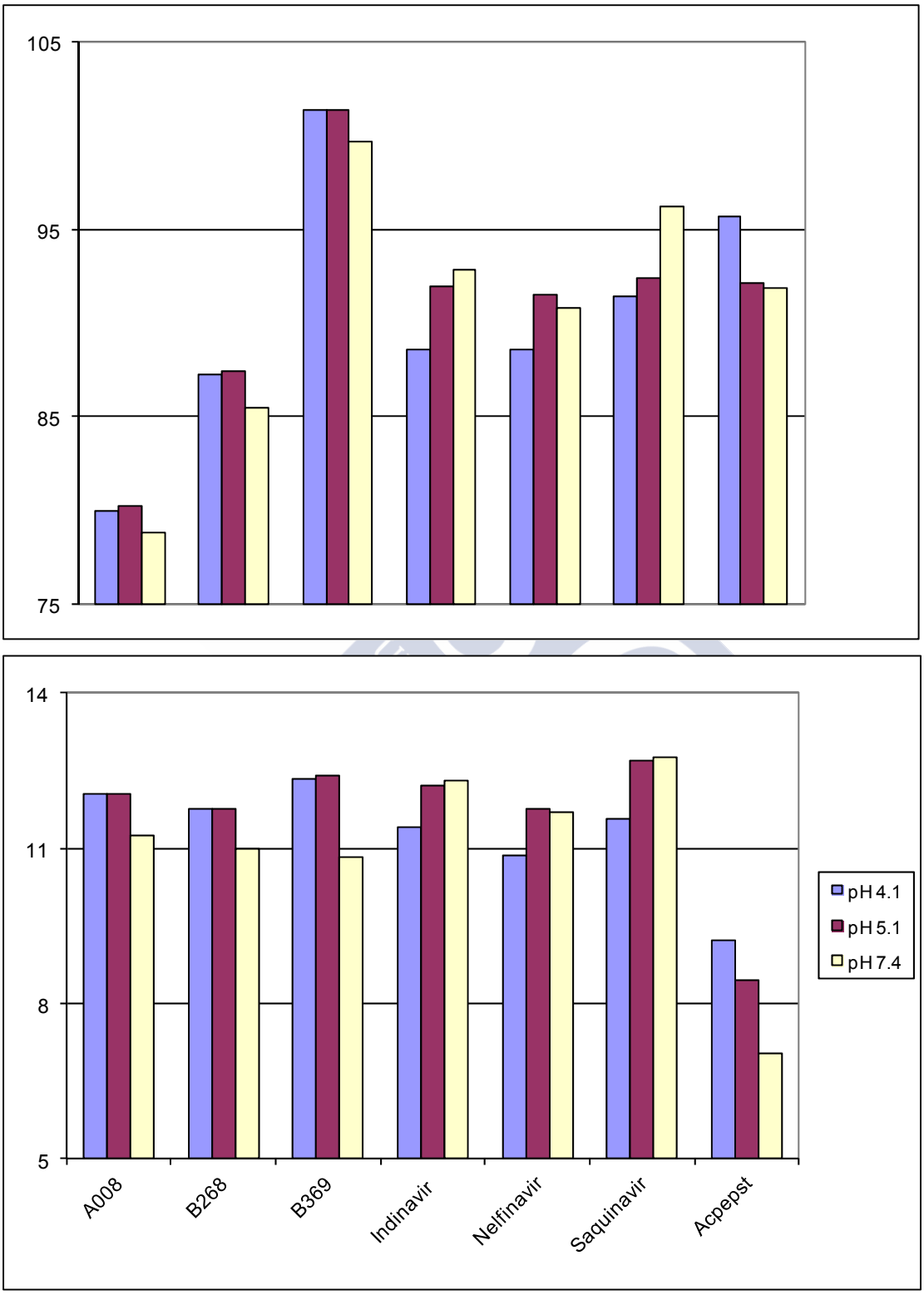


Figura 3.10. Comparación entre las afinidades a los distintos valores de pH obtenidas por SPR (parte inferior) y los calculados por nuestra función en valores absolutos (parte superior). Los valores se dan en kcal/mol.

Los resultados aquí descritos sugieren la posibilidad de diseñar inhibidores con distintas dependencias de la afinidad con el pH. Por ejemplo, creemos que el cambio del grupo carboxilato en el extremo C-terminal de la acetilpepstatina por un grupo polar no cargado (como una amida) supondría un incremento (en lugar de una pérdida) de afinidad cuando el pH sube de 5.1 a 7.4.

Las tendencias experimentales de afinidad entre inhibidores a un pH dado no se reproducen tan bien como aquellas relativas al incremento del pH para un mismo inhibidor. Esto se puede deber a la contribución del factor entrópico entre los inhibidores con sustanciales diferencias estructurales. Así por ejemplo, se predice una mayor afinidad de la acetilpepstatina sobre A008, en contraste con la tendencia experimental. El estudio de las estructuras de ambos inhibididores muestra que el primero es un ligando peptídico con una mayor cantidad de grados de libertad que A008 y por lo tanto sufriría un penalizador entrópico mucho mayor para enlazarse con la enzima. La inclusión de los términos entrópicos debería acercar el ranking predicho a los valores experimentales.

3.3.3.- Conclusiones.

Hemos empleado nuestro protocolo basado en mecánica molecular para proporcionar una explicación racional a los resultados obtenidos cuando se determina experimentalmente la dependencia de la afinidad de enlace de una serie de inhibidores con HIV-1 PR en función del pH. Nuestro protocolo requiere conocer los estados de protonación de todos los residuos ionizables en los complejos enzima-inhibidor a los tres valores de pH empleados en los estudios. En consecuencia, es esencial disponer de los valores de pK_a de todos los residuos ionizables. Hemos validado el algoritmo de predicción de pK_a empleado mediante los cálclulos de los valores de pK_a para todos los residuos ionizables del complejo HIV-1 PR/DMP323, comparando los valores calculados resultantes con los valores experimentales determinados por estudios de RMN. Los resultados indican que nuestros cálculos reproducen los valores experimentales correctamente, lo que valida nuestro protocolo de predicción de pK_a.

Nuestros cálculos muestran que al enlazarse el inhibidor, varios residuos ionogénicos presentan cambios notables de sus valores de pK_a en comparación con sus valores estándares en disolución. Los mayores incrementos en pK_a se observan en los ácidos aspárticos de la díada catalítica. Creemos que un enlace de hidrógeno de baja barrera (LBHB) entre uno de los oxígenos carboxílicos de uno de los ácidos aspárticos de la díada y el hidroxilo del ligando es esencial para entender los estados de protonación de la díada catalítica cuando la enzima se encuentra ligada a un inhibidor, lo que permite aproximar nuestros resultados calculados a las observaciones experimentales.

En su mayor parte, las diferencias de energía de enlace observadas experimentalmente en función de la variación del pH son reducidas. Aún así, las tendencias en las afinidades de enlace calculadas debido al incremento del pH apoyan, con algunas excepciones, los resultados observados en los experimentos de SPR. Nuestras predicciones de afinidad de enlace soportan nuestras asignaciones de protonación. Además, hemos demostrado que los estados de protonación alternativos (que podrían estar presentes mediante el incremento de la constante diélectrica del interior de la proteína) no son capaces de reproducir las tendencias de afinidad

de enlace experimentales, un resultado que refuerza nuestra asignación de carga a los residuos ionizables. Por otro lado, las tendencias de afinidad de enlace de un inhibidor a otro a un valor de pH dado no se reproducen de manera igualmente satisfactoria en nuestros cálculos, ya que éstos carecen de una evaluación completa de los factores entrópicos.

Nuestros cálculos apoyan la hipótesis de que a un valor de pH dado, algunos residuos ácidos contribuyen a la afinidad de enlace de la enzima a través de estados de carga tanto protonados como cargados. Además, nuestros resultados también indican que los grupos titulables del inhibidor pueden tener un efecto notable en las tendencias de afinidad de enlace mediante la modificación de su estado de carga durante un cambio de pH. Finalmente, nuestros estudios muestran la posibilidad de diseñar inhibidores novedosos con perfiles alternativos de afinidad de enlace según el pH.

3.4.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GLOBALES.

El estudio de la naturaleza de la protonación del sitio activo de las aspartil proteasas, en particular de BACE-1, es un objetivo clave de esta tesis, ya que un mayor entendimiento del funcionamiento de este sitio activo nos permitirá a su vez diseñar inhibidores más potentes para esta enzima, diana terapéutica clave de la enfermedad de Alzheimer. Los ligandos elegidos en el estudio de otra aspartil proteasa (HIV-1 PR) nos han permitido obtener un mayor conocimiento sobre el papel que la variación en el estado de carga de los inhibidores puede tener sobre la capacidad de los mismos para establecer complejos con las aspartil proteasas. Durante todo el capítulo, hemos hecho hincapié en como el estado de carga de la proteína e inhibidor varían en función del entorno y cómo el comportamiento del complejo al variar el pH del entorno se ve afectado por la naturaleza química del inhibidor.

Hemos estudiado como la carga del inhibidor influye en el estado de carga de las aspartil proteasas, particularmente de la díada aspártica catalítica, y en la capacidad de formar complejos. Esta dependencia se estudia en mayor detalle, para el caso de BACE-1, en el capítulo 4, y los resultados obtenidos tanto de estos estudios como de los presentados en el siguiente capítulo han servido como base a la hora de llevar a cabo los estudios de diseño de nuevos fármacos presentados en el capítulo 5.

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido publicados en los siguientes artículos:

J.L. Domínguez, T. Christopeit, M.C. Villaverde, T. Gossas, J.M. Otero, S. Nyström, V. Baraznenok, E. Lindström, U.H. Danielson, F. Sussman. *Biochemistry* **2010,** *49.* 7255-7263

F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, R.J. Estévez, J.C. Estévez. *J. Med. Chem.* **2011,** *54,* 3081-3085

J.L. Domínguez, T. Gossas, M.C. Villaverde, U.H. Danielson, F. Sussman. *Bioorg. Med.Chem.* **2012,** *20,* 4838-4847

F. Sussman, M.C. Villaverde, J.L. Domínguez, U.H. Danielson, *Curr. Pharma. Design* **2013**, *19*, 4257-4275

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4.

ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DEL PH EN EL ACOPLAMIENTO PARA BACE-1

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1.- INTRODUCCIÓN.

La predicción del estado de protonación de los residuos ionizables del sitio activo es una de las mayores barreras a superar a la hora de llevar a cabo campañas de "screening" (búsqueda de ligandos para una diana proteica) *in silico* basadas en fragmentos para BACE-1. Las primeras campañas empleaban un estado monoprotonado de la díada aspártica catalítica, basándose en la hipótesis según la cual la mayoría de los ligandos inducen este estado de protonación de la díada. [74,80,118] Como hemos visto en el capítulo anterior, nuestros estudios han proporcionado pruebas sólidas según las cuales el estado de carga de los residuos ionizables de BACE-1 depende en gran medida de la naturaleza química del inhibidor,[81,82] por lo que cualquier protocolo de *screening* requeriría la predicción del estado de protonación de los residuos ionizables del sitio activo (ligado a un inhibidor específico) previo a los cálculos de acoplamiento (*docking*).

La influencia del estado de protonación de BACE-1 en el acoplamiento ha generado mucho interés en los últimos años; sin embargo, este interés se ha centrado principalmente en la díada aspártica catalítica del sitio activo, ignorando el efecto de los otros residuos ácidos enterrados dentro de esta enzima.[80,119,120] Por ejemplo, Kacker y colaboradores[119] emplearon una combinación bastante sofisticada de mecánica cuántica y simulaciones de mecánica molecular para predecir el estado de protonación de la díada aspártica catalítica para los estudios subsiguientes de autoacoplamiento (*self-docking*), acoplamiento cruzado (*cross-docking*), y cribados de alto rendimiento (*high throughtput screening*). Por otra parte, Barman y Prabhakar[120] han investigado todas las alternativas de carga de la díada aspártica catalítica para predecir qué combinación de carga genera el mayor enriquecimiento en las simulaciones de autoacoplamiento. Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento no se han llevado a cabo cálculos de acoplamiento que tomen en cuenta el efecto del pH sobre el acoplamiento de los ligandos con esta enzima.

Como hemos discutido en capítulos anteriores, las estructuras cristalográficas de los complejos de BACE-1 se han determinado generalmente a valores de pH cercanos al valor neutro. Por tanto, se obtendría un mayor éxito en los resultados de autoacoplamiento si usamos el estado de protonación de ligando y proteína a este valor de pH. Por otra parte, la mayoría de los ensayos de inhibición de BACE-1 se llevan a cabo a un valor de pH ácido, en el intervalo óptimo de funcionamiento de la enzima (4.5-5.0). El estado de carga de la díada catalítica y otros residuos ionizables de BACE-1 es, con toda probabilidad, diferente al pH óptimo de actividad de la enzima y a pH al cual se obtienen las estructuras cristalográficas. Para resolver la cuestión planteada, hemos empleado un protocolo que combina la predicción del pK_a de los residuos ionizables de BACE-1 con simulaciones de acoplamiento.

En este capítulo nos hemos centrado en diversas cuestiones relevantes sobre el protocolo de cálculo de acoplamiento entre ligandos y BACE-1. Una de estas cuestiones es si el ligando, en su unión a la enzima, cambia su estado de protonación al modificar el pH del entorno. Otro de los interrogantes a despejar se encuentra en los cambios de los estados de protonación de los

118. T. Polgár, C. Magyar, I. Simon, G.M. Keserü *J. Chem. Inf. Model* **2007**, *47*, 2366-2373
119. P. Kacker, M. Masetti, M. Mangold, G. Bottegoni, A. Cavalli. *J. Chem. Inf. Model* **2012**, *52*, 1079-1085
120. A. Barman, R. Prabhakar, *J. Chem. Inf. Model.* **2012,** *52,* 1275-1287

residuos ionizables de la proteína con el pH y cómo estos cambios afectan a la conformación de enlace del ligando. Para evaluar nuestros resultados emplearemos, entre otras medidas, la cercanía de las poses generadas durante los estudios de acoplamiento con las poses resultantes de los estudios cristalográficos a pH neutro, así como la concordancia entre las energías de enlace calculadas y las afinidades obtenidas experimentalmente al pH óptimo de actividad de esta enzima.

4.2.- METODOLOGÍA.

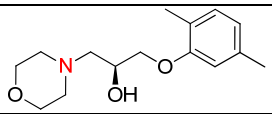
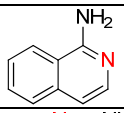
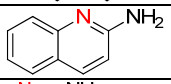
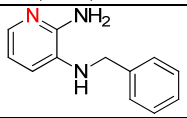
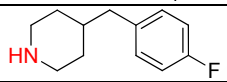
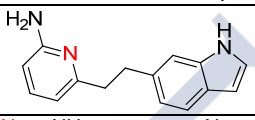
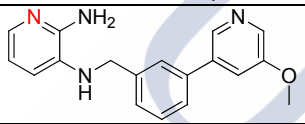
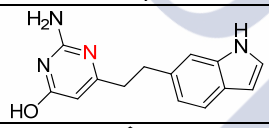
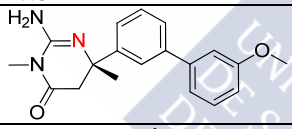
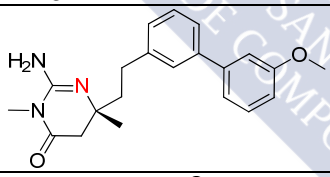
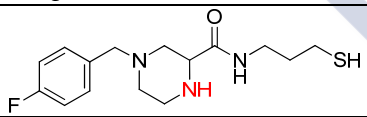
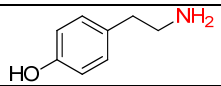
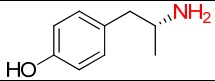
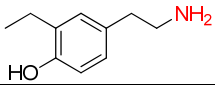
4.2.1.- Selección y preparación de candidatos.

El grupo de 23 fragmentos de inhibidor de BACE-1 estudiados se presentan en la Tabla 4.1. Se conocen las estructuras de 20 de los 23 complejos de ligando enlazados a BACE-1, y su código de depósito en el PDB se incluye en la tabla como identificador del ligando. El peso molecular de la mayoría de compuestos es inferior a 350 Da (un valor ligeramente superior al límite de 300 Da establecido para fragmentos), lo que los convierte en buenos candidatos a fragmentos inhibidores para el desarrollo de fármacos. Los tres últimos compuestos de la lista (3H0B0, 3H0BM y 3H0BS) representan pequeñas modificaciones del compuesto de código de depósito en el PDB 3H0B. Se han estudiado estas variantes debido a que, hasta donde alcanza nuestra búsqueda bibliográfica, son los únicos compuestos para los que se han publicado afinidades de enlace a diferentes valores de pH (en este caso, 4.5 y 6.5), y por tanto estos datos son útiles para probar nuestra aproximación. Las afinidades de todos los compuestos por BACE-1 se muestran en la Tabla 4.1, en forma de IC_{50} o K_D. Como se aprecia en la tabla, las afinidades de enlace cubren un amplio espectro, desde el rango milimolar al rango sub-micromolar. La eficiencia de ligando (LE) se define como el cociente entre la energía libre de Gibbs de enlace del complejo y el número de átomos pesados del ligando.[121]

Obtuvimos las coordenadas de los complejos de BACE-1 del Protrein Data Bank (PDB). Sobre estas coordenadas incorporamos los hidrógenos empleando el software Discovery Studio.[95] La mayoría de las estructuras poseen una resolución por debajo de 2.5 Å, aunque todos los complejos presentan una o más discontinuidades en sus secuencias de residuos. El punto más habitual de comienzo de los tramos de desconexión en la cadena es en torno al residuo 157 y se extiende en un intervalo de 9 a 12 residuos (variando para cada caso). Otro tramo de desconexión en la cadena que se encuentra en bastantes estructuras comienza en torno al residuo 310 y se extiende en un intervalo de 6 a 7 residuos. Hemos reconstruido los fragmentos ausentes en la cadena copiando los tramos equivalentes del complejo de BACE-1 identificado como 1FKN en la base de datos del PDB, y optimizando la estructura alrededor del punto de inserción mediante un protocolo de minimización de energía, para el que empleamos el software Discovery Studio (ver capítulo 3).[95]

121. P.D. Edwards, J.S. Albert, M. Sylvester, D. Aharony, D. Andisik, O. CAlalghan, J.B. Campbell, R.A. Carr, G. Chessari, M. Congreve, M. Frederikson, R.H.A. Folmer, S. Geschwindner, G. Koether, K. Kolmodin, J. Krumrine, R.C. Mauger, C.W. Murray, L.L. Olsson, S. Patel, N. Spear, G. Tian. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5912-5925

Tabla 4.1.- Estrucutras y datos de inhibición de BACE-1 de los candidatos estudiados.

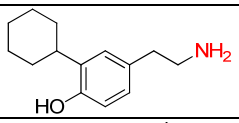
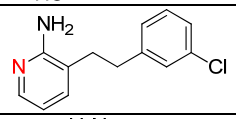
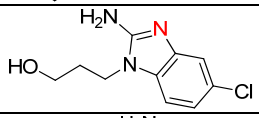
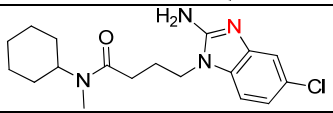
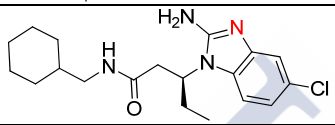
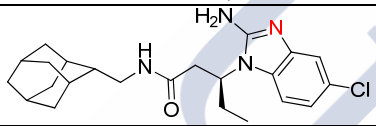
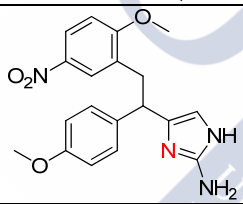
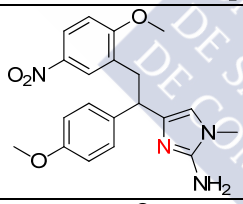
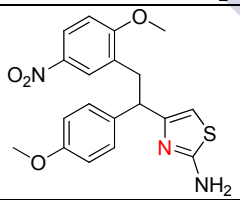
PDB Id.	Estructura[1]	pK_a[2]	IC_{50} (μM)	K_D (μM)	LE	Ref.
2OF0		6.5[a]	>2000		< 0.19	32
2OHK		7.5[a]	~ 2000		0.3	32
2OHL		6.7[a]	~ 2000		0.3	32
2OHM		6.8[a]	310		0.32	32
2OHN		10.6[a]	~ 500		0.32	32
2OHP		6.8[a]	94		0.31	122
2OHS		6.6[a]	40		0.32	122
2VA5		3.3[a]	130		0.28	122
2VA6		7.7[a]	0.38		0.36	122
2VA7		8.3[a]	0.20		0.37	122
2ZJK		7.4[a]		> 1.000		123
3BRA		9.5[a]		2000	0.37	124
3BUF		9.8a		800	0.38	124
3BUG		9.9a		660	0.36	124

122. M. Congreve, D. Aharony, J. Albert, O. Callaghan, J. Campbell, R.A.E. Carr, G. Chessari, S. Cowan, P.D. Edwards, M. Frederickson, R. McMenamin, C.W. Murray, S. Patel, N. Wallis. *J. Med. Chem.* **2007,** *50,* 1124-1132

123. W. Yang, R.V. Fucini, B.T. Fahr, M. Randal, K.E. Lind, M.B. Lam, W. Lu, Y. Lu, D.R. Cary, M.J. Romanowski, D. Colussi, B. Pietrak, T.J. Allison, S.K. Munshi, D.M. Penny, P. Pham, J. Sun, A.E. Thomas, J.M. Wilkinson, J.W. Jacobs, R.S. McDowll, M.D. Ballinger, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4488-4499

124. A. Kulgstatter, M. Stahl, J.W. Peters, W. Huber, M. Stihle, D. Schlatter, J. Benz, A. Rug, D. Roth, T. Enderle, M. Henning *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1304-1307

Tabla 4.1. (Cont)

PDB Id.	Estructura[1]	pK_a[2]	IC_{50} (μM)	K_D (μM)	LE	Ref.
3BUH		9.9[a]		220	0.32	124
3KMY		7.2[b]		32	0.38	125
3MSJ		7.7[b]	770		0.29	126
3MSK		7.7[c]	26		0.27	126
3MSL		7.7[c]	7		0.29	126
3MSM		7.7[c]	8.9		0.26	126
3H0B0		8.1[b]	5.7		0.27	102
3H0BM		8.3[b]	0.47		0.31	102
3H0BS		5.5[b]	1.1		0.30	102

[1]El átomo de nitrógeno con mayor probabilidad de protonación se resalta en rojo.
[2]Los valores de pK_a se han obtenido de una de las tres siguientes fuentes, indicadas para cada fragmento: a) Resultados estimados en Scifinder[127]. b) Valor bibliográfico. c) Estimación por analogía.

Para asignar los estados de protonación de los residuos en BACE-1, calculamos los valores de pK_a de dichos residuos mediante el empleo del protocolo propio del software Discovery Studio llamado CPIRpK[88] (Calculate Protein Ionization and Residue p*K*, o Cálculo de la ionización de

125. Y.S. Wang, C. Strickland, J.H. Voigt, M.E. Kennedy, B.M. Beyer, M.M. Senior, E.M. Smith, T.L. Nechuta, V.S. Madison, M- Czarniecki, B.A. McKittrick, A.W. Stamford, E.M. Parker, J.C. Hunter, W.J. Greenlee, D.F. Wyss. *J. Med. Chem.* **2010,** *53,* 942-950
126. J. Madden, J.R. Dod, R. Godemann, J. Kraemer, M. Smith, M. Biniszkiewicz, D.J. Hallet, J. Barker, J.D. Dyekjaer, T. Hesterkamp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5329-5333
127. Resultados de Scifinder calculados empleando ACD/Labs Software V 11.02. Advanced Chemistry Development Inc. Toronto, ON

proteína y pK_a de residuo), que evalúa los efectos de la solvatación y los residuos del entorno de cada residuo ionizable en el pK_a del mismo mediante una aproximación del algoritmo Generalized Born. Este protocolo permite obtener resultados de pK_a acertados con muy poco coste computacional, como se ha demostrado en el capítulo 3 de esta tesis.

Para nuestros cálculos, determinamos el estado de protonación de la proteína en los diferentes complejos a dos valores distintos de pH (4.5 y 7.4). Dado que la mayoría de estudios de difracción de rayos X que han proporcionado la posición de ligando observada han sido obtenidos a valores de pH próximos al neutro, procedimos a asignar los estados de carga de los residuos de BACE-1 de a pH 7.4 de acuerdo con sus valores de pK_a. Por otra parte, el estudio de acoplamiento a un pH ácido próximo al pH óptimo de actividad catalítica de la enzima (4.5) se perfila también como un objetivo importante, ya que la mayoría de ensayos enzimáticos de inhibición se llevan a cabo a valores de pH cercanos a éste. En el caso de los análogos de 3H0B, los autores[102] han estudiado el efecto del pH en el enlace de inhibidor a pH 4.5 y 6.5. A efectos de comprobar la validez de nuestro protocolo, hemos calculado la afinidad de enlace del ligando 3H0BS a pH 6.5 además de a los valores de pH indicados anteriormente.

El estado de protonación del inhibidor es un factor crucial en la predicción de la carga del sitio activo de BACE-1. Como se puede ver en la Tabla 4.1, la mayoría de inhibidores tienen uno o varios grupos amino que pueden interactuar con la díada aspártica catalítica mediante interacciones electrostáticas. Para determinar la probabilidad de encontrar el ligando protonado a cada valor de pH empleamos los valores de pK_a obtenidos de la bibliografía correspondiente o estimados mediante el predictor de ACD Labs. disponible en SciFinder.[127] En la Tabla 4.1 se resaltan en rojo los átomos de nitrógeno para cuyos grupos amino protonados se predice un valor de pK_a más elevado.

4.2.2.- Acoplamiento y Reevaluación.

Las estructuras de BACE-1 con los estados de carga de los residuos ionizables asignados tanto a pH 4.5 como a pH 7.4 nos sirvieron como plantilla para los estudios de acoplamiento realizados con GOLD.[128] Configuramos los cálculos de GOLD para que nos proporcionasen 25 resultados de salida, con un número de iteraciones del algoritmo genético de un mínimo de 1.000.000 y un máximo de 1.250.000 iteraciones. Para asegurarnos una mayor variabilidad en las poses finales, empleamos la opción de configuración de soluciones diversas de GOLD, que impide que se formen grupos de posiciones muy similares en los resultados. Para generar las poses de los complejos, se emplearon las siguientes funciones residentes en GOLD: *ChemScore*,[129,130] *GoldScore*,[131,132] y *ChemPLP*.[133] Sometimos cada una de las poses obtenidas a un proceso de reevaluación de acoplamiento con las tres técnicas descritas. Además, en trabajos anteriores se ha corroborado que el uso de funciones de mecánica molecular aumenta la cantidad de poses de salida cercanas a la posición observada cristalográficamente, y más específicamente

128. GOLD. Versión 5.1. Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge (Reino Unido)
129. M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445
130. C.A. Baxter, C.W. Murray, D.E. Clark, D.R: Westhead, M.D. Eldridge, *Proteins* **1998,** *33*, 367-382
131. G. Jones, P. Willet, R.C. Glen. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*. 43-53
132. G. Jones, P. Willet, R.C. Glen, A.R. LEach, R. Taylor. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748
133. O. Korb, T.Stützle, T.E. Exner, *J. Chem. Inf. Mol.* **2009**, *49,* 84-86

reduce el número de falsos positivos y negativos en campañas de búsqueda de ligandos para dianas proteicas.[134,135] De acuerdo con esta observación, hemos llevado a cabo la reevaluación de nuestro conjunto de poses, obtenido de las simulaciones de acoplamiento, tomando como referencia la energía de interacción entre proteína y ligando, calculada mediante dos funciones de reevaluación basadas en mecánica molecular empleando CHARMM, y que se describen en mayor detalle en el siguiente apartado.

4.2.3.- Funciones de evaluación.

4.2.3.1.- ChemScore.

ChemScore[129,130] es una función de evaluación cuyos parámetros han sido derivados de manera empírica de un grupo de ajuste de 82 complejos proteína-ligando para los cuales se disponía de información sobre su energía de enlace. *ChemScore* estima el cambio de de la energía libre total de la proteína al enlazarse con el complejo de la siguiente manera:

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_0 + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{metal} + \Delta G_{lipo} + \Delta G_{rot}$$

Cada componente de esta ecuación es el resultado de un término dependiente de la magnitud de la contribución de un fenómeno físico particular, donde $\Delta G_{binding}$ indica término de enlace proteína-ligando, ΔG_{hbond} indica término de enlace de hidrógeno, ΔG_{metal} indica término metálico, ΔG_{lipo} indica término lipofílico, y ΔG_{rot} indica término de fijación de rotación de enlace. Se añade además un factor de escalado determinado por regresión. Así tenemos:

$$\Delta G_0 = v_0$$

$$\Delta G_{hbond} = v_1 + P_{hbond}$$

$$\Delta G_{metal} = v_2 + P_{metal}$$

$$\Delta G_{lipo} = v_3 + P_{lipo}$$

$$\Delta G_{rot} = v_4 + P_{rot}$$

donde los términos v son los coeficientes de regresión y los términos P son las contribuciones físicas al enlace. El valor final de *ChemScore* se obtiene mediante la adición de un penalizador de colisión (indicado como P_{clash} en la ecuación subsiguiente) y términos de torsión interna (indicados como $P_{internal}$), que corrigen contactos demasiado cercanos en simulaciones de acoplamiento y conformaciones internas inadecuadas. También es posible incluir términos covalentes ($c_{covalent}$, $P_{covalent}$) o de restricciones de distancia ($P_{constraints}$). Por lo tanto, la ecuación final para definir el resultado de acoplamiento empleando *ChemScore* como función de evaluación es la siguiente:

$$ChemScore = \Delta G_{binding} + P_{clash} + c_{internal}P_{internal} + (c_{covalent}P_{covalent} + P_{constraint})$$

4.2.3.2.- GoldScore.

La función de evaluación de *GoldScore*[131,132] se compone de cuatro partes: La interacción de enlace de hidrógeno entre ligando y proteína ($S_{external\ H\text{-}bond}$), la energía de interacción proteína-

134. D. Hoffman, B. Kramer, T. Washio, T. Steinmetzer, M. Rarey, T. Lengauer. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4422-4433
135. M.P. Glesson, D. Gleeson. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49,* 1437-1448

ligando de Van der Waals ($S_{external\ vdw}$), la energía interna de van der Waals del ligando ($S_{internal\ vdw}$), y la energía de torsión del ligando ($S_{internal\ torsion}$), con lo que la ecuación que define el valor de evaluación de enlace ($S_{binding}$) según *GoldScore* es como sigue:

$$S_{binding} = - (S_{external\ H\text{-}bond} + 1{,}375 \cdot S_{external\ vdw} + S_{internal\ vdw} + S_{internal\ torsion})$$

De manera opcional, se puede añadir un quinto término, que representa la energía de enlace de hidrógeno intramolecular del ligando ($S_{internal\ H\text{-}bond}$). Si se han especificado restricciones, una contribución adicional de restricciones - (S_{con}) - se añadiría al valor de evaluación final. De la misma manera, si se hace el acoplamiento de ligandos unidos covalentemente a la enzima, se añade un término covalente (S_{cov}), con lo que la ecuación con estos términos variables es como sigue:

$$S_{binding} = - (S_{external\ H\text{-}bond} + 1{,}375 \cdot S_{external\ vdw} + S_{internal\ vdw} + S_{internal\ torsion} + S_{internal\ H\text{-}bond} + S_{con} + S_{cov})$$

El resultado de evaluación se obtiene como el negativo de la suma de los términos componentes de energía, con lo que un valor más alto predice una mejor posición de enlace. Como indica la ecuación, el valor $S_{external\ vdw}$ se multiplica por un factor de 1,375 al realizar este cálculo, una corrección empírica para promover el contacto hidrofóbico entre ligando y proteína. Esta función de evaluación ha sido optimizada para predecir la posición de enlace del ligando en lugar de la afinidad de enlace, aunque se ha encontrado cierta correlación con esta última.

4.2.3.3.- ChemPLP.

ChemPLP[133] es una función de evaluación empírica optimizada para predicción de poses. Se emplea el Potencial Linear de Fragmentos (Piecewise Linear Potential, f_{PLP}) para modelizar la complementariedad estérica entre proteína y ligando, además de los términos dependientes de distancia y ángulo de los enlaces de hidrógeno y metálicos ($f_{chem\text{-}hb}$, $f_{chem\text{-}cho}$ para hidrógeno, $f_{chem\text{-}met}$ para metales) y el término de enlace covalente ligando-inhibidor, en caso de ser aplicable ($f_{chem\text{-}cov}$). El valor interno del ligando se compone del potencial de choque de átomos pesados ($f_{lig\text{-}clash}$) y el potencial de torsión ($f_{lig\text{-}tors}$). Además, entran en consideración los componentes de energía de la proteína (f_{prot}), y el factor de restricciones del ligando (f_{cons}). A aquellas funciones f en las que es necesario, se les adjunta el peso ω adecuado.

$$Fitness_{ChemPLP} = - (\omega_{PLP} \cdot f_{PLP} + \omega_{lig\text{-}clash} \cdot f_{lig\text{-}clash} + \omega_{lig\text{-}tors} \cdot f_{lig\text{-}tors} + \omega_{prot} \cdot f_{chem\text{-}prot} + \omega_{cons} \cdot f_{cons} + f_{chem\text{-}cov} + f_{chem\text{-}hb} + f_{chem\text{-}cho} + f_{chem\text{-}met})$$

Como indica la ecuación, el valor de fitness es la suma de los factores anteriormente citados, con los pesos correspondientes. El signo negativo en la ecuación (se convierte de valor negativo a positivo) nos indica que una pose es mejor cuanto más alto es su valor de fitness.

4.2.3.4.- Charmm y h.Charmm.

Para la primera función de reevaluación basada en mecánica molecular (referida como *Charmm*), las poses de cada ligando se sometieron únicamente a una minimización de hidrógenos, llevada a cabo en dos etapas: una primera etapa de minimización tipo Steepest Descent de 2.000 pasos, seguida de una segunda etapa de 50.000 pasos de minimización tipo ABNR, ambas con un gradiente de tolerancia de 0,002. La segunda función de reevaluación (referida como *h.Charmm*) implica un protocolo de mecánica molecular en el que los átomos pesados de proteína y ligando están restringidos en su movimiento por un potencial armónico

con una constante de fuerza igual al doble del valor de masa atómica de cada átomo. Aparte de esta salvedad, el proceso de minimización siguió los mismos pasos que el proceso de *Charmm*, descrito anteriormente. En ambos casos, clasificamos las estructuras por el valor de energía de enlace de mecánica molecular según la aproximación del cuerpo rígido que incluye un modelo implícito de Generalized Born con una función de desolvatación de interrupción sencilla (Generalized Born with a Simple Switching, GBSW).[87] El campo de fuerzas elegido para llevar a cabo nuestro estudio fue CHARMM, debido a la elevada disponibilidad de parámetros para fragmentos no peptídicos en este campo de fuerzas. Realizamos los cálculos empleando la versión 34b2 del programa CHARMM.[97]

En ambos casos, el valor de reevaluación para CHARMM se calcula como la diferencia entre el total de energía calculada del complejo y la suma de sus componentes por separado (proteína y ligando). Esta energía se expresa con el signo cambiado, resultando en la siguiente ecuación, donde ΔE indica energía:

$\Delta E_{reevaluación} = -(\Delta E_{complejo} - (\Delta E_{proteína} + \Delta E_{ligando}))$

4.2.4.- Evaluación de los resultados de Acoplamiento.

La métrica para los cálculos de autoacoplamiento que se han llevado a cabo empieza con el cálculo de la RMSD (*Root Mean Square Deviation*, o desviación de la raíz cuadrada de la media de los cuadrados) de las coordenadas del ligando comparando una o más de las poses de mayor rango de las soluciones de acoplamiento y la posición en el complejo de la estructura cristalográfica. Hemos definido el rendimiento del acoplamiento como el porcentaje de complejos en un grupo para el cual la RMSD entre las mejores soluciones de salida y la estructura cristalográfica está por debajo de un determinado valor de corte. En la bibliografía, se emplea a menudo un valor de referencia de 2,0 Å; sin embargo, en el caso de fragmentos, se ha observado recientemente que un valor de corte más bajo (1,5 Å) es más adecuado, ya que las poses en el intervalo de 1,5 a 2,0 Å pueden contener errores significativos y la orientación global del ligando puede variar drásticamente en comparación con las estructuras observadas experimentalmente.[136]

En nuestros cálculos, la probabilidad de éxito de una simulación dada dependerá de varios parámetros, tales como la función de acoplamiento con la que se generaron las poses, el pH del entorno, la carga del inhibidor, y la función de reevaluación empleada. Para cualquier posible combinación de estos factores, hemos definido la fracción de éxito del compuesto *i* [FE(*i*)] mediante la siguiente ecuación:

$$FE(i) = \frac{NC(i)}{NT} \qquad (4.1)$$

Donde NC(i) es el número de poses con un RMSD inferior a 1.5 Å y NT el número total de mejores posiciones en la clasificación.

136. M.L. Verdonk, I. Giangreco, R.J. Hall, O. Korb. P.N. Mortenson, C.W. Murray. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5422-5431

La fracción de éxito total, expresada en forma de porcentaje, para todos los ligandos aquí estudiados a un valor de pH dado para cada una de las funciones de reevaluación se puede calcular mediante la siguiente ecuación, donde NL es el número total de ligandos:

$$Hit\% = \frac{\Sigma FE(i)}{NL} * 100 \qquad (4.2)$$

Una estadística opcional empleada por otros grupos es calcular el índice de éxito localizando para cada compuesto al menos una pose entre las NT mejores (para un intervalo de RMSD dado), para después aplicar la ecuación 4.2. Cuando se usa este método, como han hecho recientemente Kacker y colaboradores,[119] un incremento del valor de NT resulta en un incremento sustancial de la proporción de enriquecimiento.

4.3.- RESULTADOS.

4.3.1.- Estado de protonación de los inhibidores y de los residuos ionizables de BACE-1.

Un examen de las estructuras de rayos-X de los fragmentos enlazados a BACE-1 presentados en la Tabla 4.1 indica que dichos compuestos se anclan a la díada aspártica a través de sus grupos amino, ya sea por enlace de hidrógeno o interacción electrostática de par iónico. Por tanto, identificar cual de los grupos amino presenta una mayor probabilidad de protonación es esencial para predecir la pose de enlace.

Como se ha visto en la Tabla 4.1, el valor de pK_a en disolución del grupo amino protonado en varios de los fragmentos está cerca o por encima de 7.0. Si tomamos en consideración estos valores de pK_a en disolución, 15 de los compuestos estudiados (los identificados en la Tabla 4.1 como ligandos de los complejos 2OHK, 2OHN, 2VA6, 2VA7, 2ZJK, 3BRA, 3BUF, 3BUG, 3BUH, 3MSJ, 3MSK, 3MSL, 3MSM, 3H0B0 y 3H0BM) estarán cargados a pH 4.5 y 7.4, mientras que 8 (los identificados en la Tabla 4.1 como pertenecientes a los complejos 2OF0, 2OHL, 2OHM, 2OHP, 2OHS, 2VA5, 3KMY, 3H0BS) sólo estarán cargados a pH ácido. De cualquier manera, el valor de pK_a puede variar debido a la proximidad de residuos ionizables, tales como los residuos aspárticos de la díada catalítica. Por ejemplo, nuestra búsqueda en la bibliografía de la estructura de 2-aminopirimidina presente en el inhibidor 2VA5 indica que el nitrógeno en la posición 3 (el más cercano al grupo hidroxilo) es el que posee un valor de pK_a superior. Sin embargo, el nitrógeno a distancia de enlace de la díada aspártica catalítica en la estructura cristalográfica está en la posición 1 del anillo pirimidínico, y por tanto debería ser el grupo más fácilmente protonable. Como veremos en la discusión, este segundo estado de protonación es el que resulta en mejores resultados de acoplamiento.

Tras llevar a cabo la identificación preliminar de los grupos amino protonados en estos fragmentos, calculamos los valores de pK_a para todos los residuos ionizables de BACE-1 tanto para los casos de ligando neutro como para los casos de ligando protonado. La Tabla 4.2 muestra los valores de pK_a para los residuos de la díada aspártica catalítica cuando los ligandos están protonados y neutros. Como se puede observar, el estado de carga del inhibidor afecta de manera notable al pK_a de los residuos aspárticos catalíticos. Así, el asignar un estado protonado a un inhibidor reduce de manera sustancial los valores de pK_a de los resíduos

arspárticos de la díada catalítica. Los valores de pK_a resultantes nos han permitido predecir el estado de protonación de estos residuos a los valores de pH empleados en nuestros estudios (4.5 y 7.4). Los resultados presentados en el capítulo anterior sobre el efecto del pH en algunos ligandos peptidomiméticos de BACE-1 predicen que el residuo Asp32 presenta una mayor tendencia a permanecer protonado que Asp228 durante un amplio intervalo de pH.[81] Los resultados mostrados en la Tabla 4.2 confirman este orden de protonación para la mayoría de ligandos. Sin embargo, para algunos casos se observa que el ranking de pK_a de la díada se invierte, como en los casos de los complejos de 2OHL, 3BRA, y 3BUG con el ligando protonado. Por lo tanto se deduce que la díada aspártica es capaz de adoptar una gran variedad de estados de protonación en función del estado de carga del inhibidor y del pH del medio. Cuando se asigna una carga de +1 a los inhibidores en el pH óptimo de operación de la enzima (4.5), se predice un estado monoprotonado de la díada para la mayoría de complejos, aunque en algunos casos pueden observarse estados alternativos (p.e. díada diprotonada o dicargada). Si el pH se eleva hasta un valor próximo al neutro (7.4) se predice que el enlace con el inhibidor favorece principalmente un estado doblemente cargado de la díada.

Tabla 4.2. Valores de p*Ka* predichos para la díada aspártica catalítica en presencia del inhibidor

Complejo	Carga Ligando	pK_a	
		Asp 32	Asp 228
2OF0	Neutro	8.6	6.4
	Protonado	6.4	4.2
2OHK	Neutro	8.8	5.1
	Protonado	4.0	4.3
2OHL	Neutro	8.3	5.7
	Protonado	3.5	6.0
2OHM	Neutro	6.6	8.1
	Protonado	5.2	4.4
2OHN	Neutro	6.4	4.5
	Protonado	5.9	2.9
2OHP	Neutro	9.5	5.9
	Protonado	5.7	5.3
2OHS	Neutro	7.3	7.8
	Protonado	7.2	4.3
2VA5	Neutro	8.7	5.3
	Protonado	7.7	4.4
2VA6	Neutro	8.4	5.8
	Protonado	5.9	3.8
2VA7	Neutro	8.8	5.8
	Protonado	6.1	3.9
2ZJK	Neutro	6.2	4.8
	Protonado	6.1	4.6
3BRA	Neutro	6.5	4.7
	Protonado	4.2	5.2
3BUF	Neutro	7.0	4.7
	Protonado	4.5	5.4
3BUG	Neutro	6.5	5.1
	Protonado	4.4	5.7
3BUH	Neutro	7.0	5.0
	Protonado	4.5	5.7
3H0B0	Neutro	6.8	7.0
	Protonado	5.2	5.6
3H0BM	Neutro	7.6	6.9
	Protonado	5.0	5.7
3H0BS	Neutro	7.6	6.7
	Protonado	4.3	5.3
3KMY	Neutro	7.2	8.4
	Protonado	7.2	3.7
3MSJ	Neutro	9.0	6.7
	Protonado	6.2	5.0
3MSK	Neutro	8.4	6.0
	Protonado	5.3	4.3
3MSL	Neutro	8.1	6.0
	Protonado	5.6	3.9
3MSM	Neutro	8.6	6.0
	Protonado	5.6	3.9

La presencia de los ligandos afecta no sólo a los valores de pK_a la díada aspártica catalítica sino que además tiene una fuerte influencia en el estado de protonación de otros residuos ácidos de la enzima (ver Tablas 4.7 en el anexo al final del capítulo). Los valores de pK_a de muchos de estos residuos muestran incrementos o reducciones cuando se comparan con los valores de pK_a de los modelos estimados para estos residuos en disolución. También se observa variación

de pK_a para un residuo ácido concreto de BACE-1 cuando la enzima se encuentra enlazada a distintos inhibidores; en algunos casos, estas diferencias pueden superar una unidad de pK_a.

4.3.2.- Efecto del estado de protonación del inhibidor y la carga de los residuos de la proteína en los resultados de acoplamiento.

Para estimar el efecto del estado de carga del inhibidor y los estados de protonación de los residuos de la proteína a dos valores de pH en los resultados de acoplamiento, hemos calculado el RMSD de las poses resultantes de las simulaciones de autoacomplamiento con respecto a las poses observadas en las estructuras cristalográficas de los complejos de BACE-1. Los resultados se muestran en la Figura 4.1 (Página 77), que presenta el efecto del pH en una distribución de histograma a través de valores incrementales de RMSD, tanto para los ligandos neutros como para los ligandos protonados. La distribución de RMSD se ha calculado como el porcentaje de poses en cada intervalo indidcado en la figura entre el total de poses generadas. Como se aprecia en la figura, el estado de protonación del inhibidor tiene un efecto notable en el éxito del autoacoplamiento. La protonación de los inhibidores incrementa de manera sustancial el porcentaje de *hits* a valores de RMSD bajos (<1.5 Å) y reduce número de poses en el intervalo de RMSD más alto (>6.0 Å).

Para estudiar el efecto de la función de evaluación en el enriquecimiento de *hits*, hemos llevado a cabo una reevaluación de los *hits* de GOLD originales no sólo con algunas de las funciones de evaluación residentes en GOLD (*GoldScore*, *ChemScore*, *ChemPLP*), sino también con funciones de evaluación de *Charmm*, como se ha explicado en la sección de metodología.

Una de las principales diferencias entre ambos métodos se encuentra en la representación de los enlaces de hidrógeno y pares iónicos directos. Las funciones de evaluación basadas en mecánica molecular representan estas interacciones no covalentes mediante funciones de tipo coulómbico apantalladas mientras que las funciones de evaluación residentes en GOLD los representan como funciones de corto alcance típicas de enlace de hidrógeno. Por tanto, cuando se emplean las funciones de evaluación residentes en GOLD, los residuos de proteína ionizables que no se encuentran a distancia de enlace de hidrógeno con los grupos funcionales del inhibidor no participan en el ranking de la pose del ligando.

Por otra parte, uno de los principales problemas a la hora de comparar resultados de acoplamiento provenientes de distintos laboratorios reside en el empleo de métricas de aceptación de poses diferentes por cada grupo de investigación. Una revisión de la bibliografía muestra que una de las diferencias más notables entre los diversos estudios de acoplamiento (incluso sobre la misma proteína) es el número de poses mejor situadas en el ranking que se toman en cuenta para la búsqueda de un candidato de bajo RMSD. Estudios recientes relacionados con el efecto del estado de protonación de la díada aspártica catalítica en los cálculos de acoplamiento sobre BACE-1[119,120] han considerado el conjunto de las diez mejores poses para buscar un *hit* de RMSD inferior a 2.0 Å, mientras que otros autores emplean métricas menos permisivas que sólo consideran las respectivas poses de cabeza de tres estudios de acoplamiento paralelos.[136] Para determinar el efecto del tamaño de muestra en nuestros resultados de acoplamiento, hemos calculado el efecto de la protonación del inhibidor y del pH con un valor variable de poses. Los resultados se muestran en las Figuras

4.2, 4.3, y 4.4 (Páginas 78 a 80). La Figura 4.2 muestra el porcentaje de éxito para un RMSD < 1.5 Å respecto a la estructura cristalográfica de las tres poses mejor clasificadas; la Figura 4.3 muestra el porcentaje de acierto para identificar al menos una pose con un RMSD < 1.5 Å entre las tres mejor clasificadas de cada compuesto; finalmente, la Figura 4.4 muestra el porcentaje de acierto para identificar al menos una pose con un RMSD < 1.5 Å entre las diez mejor clasificadas de cada compuesto. Estos resultados se han obtenido mediante las ecuaciones 4.1 y 4.2 (Páginas 72 y 73). Los resultados de las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 incluyen el porcentaje de éxito de varias funciones de reevaluación tanto para ligando neutro como ligando protonado a los dos valores de pH empleados en nuestros estudios. A modo de referencia, también hemos llevado a cabo simulaciones de acoplamiento donde todos los residuos ionogénicos de la proteína se encuentran cargados, independientemente de su exposición al disolvente (estos resultados se describen como "no CPI" en las gráficas).

Uno de los resultados más sobresalientes observado en la Figura 4.2 es el marcado efecto del estado de protonación del inhibidor. Como se puede ver en las gráficas, los ligandos cargados muestran un mayor grado de éxito en comparación con los ligandos neutros, para todas las funciones de reevaluación y valores de pH empleados. Uno de los incrementos más marcados se da en los resultados de rescoring con las técnicas de mecánica molecular (*Charmm* y h.*Charmm*) de las poses generadas mediante *ChemPLP* a pH 7.4 y con la proteína ionizada completamente (no CPI). Como se aprecia en la Figura 4.2, el porcentaje de acierto se duplica, pasando de un valor aproximado del 30% a un valor aproximado del 60% cuando el ligando adquiere una carga. Para los ligandos protonados, los índices de éxito más elevados provienen de las funciones de reevaluación basadas en mecánica molecular. Por ejemplo, la función de reevaluación de tipo CHARMM con restricciones armónicas (*h.Charmm*) lleva a un procentaje de éxito del 75% en los cálculos de las estructuras generadas por *ChemScore* a pH 7.4.

La predicción correcta del estado de protonación de los residuos ionizables debería ayudar a incrementar el número de poses a valores de RMSD más bajos. Dado que las estructuras cristalográficas originales se habían obtenido a pH próximo a neutro, es de esperar que la asignación de cargas de la proteína a dicho valor de pH produzca la mayor cantidad de resultados de *hit* exitosos. Como se puede observar en la Figura 4.2, esta predicción se cumple, observándose para pH 7.4 un mayor grado de éxito, sobre todo en cálculos de reevaluación basados en posiciones generadas mediante *ChemScore*. En este caso particular (estructuras de partida de *ChemScore*, pH 7.4), el enriquecimiento del porcentaje de *hit* puede llegar al 20% comparado con pH 4.5 y al 14% comparado con no CPI, cuando se lleva a cabo el reevaluación con *h.Charmm*. El porcentaje de *hit* obtenido cuando se lleva a cabo el acoplamiento de fragmentos protonados con *GoldScore* o *ChemPLP* también indica un incremento del mismo cuando éste se lleva a cabo a pH 7.4, pero las diferencias son menores, en particular cuando comparamos resultados a pH 7.4 con no CPI. Las reducidas diferencias entre ambas distribuciones de carga se explican en parte por los valores de pK_a de los residuos del sitio activo. Como se puede ver en la Tabla 4.2, en el caso de ligando protonado a pH neutro, la díada aspártica presenta en muchos casos una carga de -2, el mismo valor que tendría cuando la enzima está completamente ionizada. Aún así, para algunos protocolos de acoplamiento se observa una diferencia notable entre pH 7.4 y no CPI. Como se ha mencionado anteriormente, es el caso para *Charmm* y *h.Charmm* con las poses generadas mediante *ChemScore*.

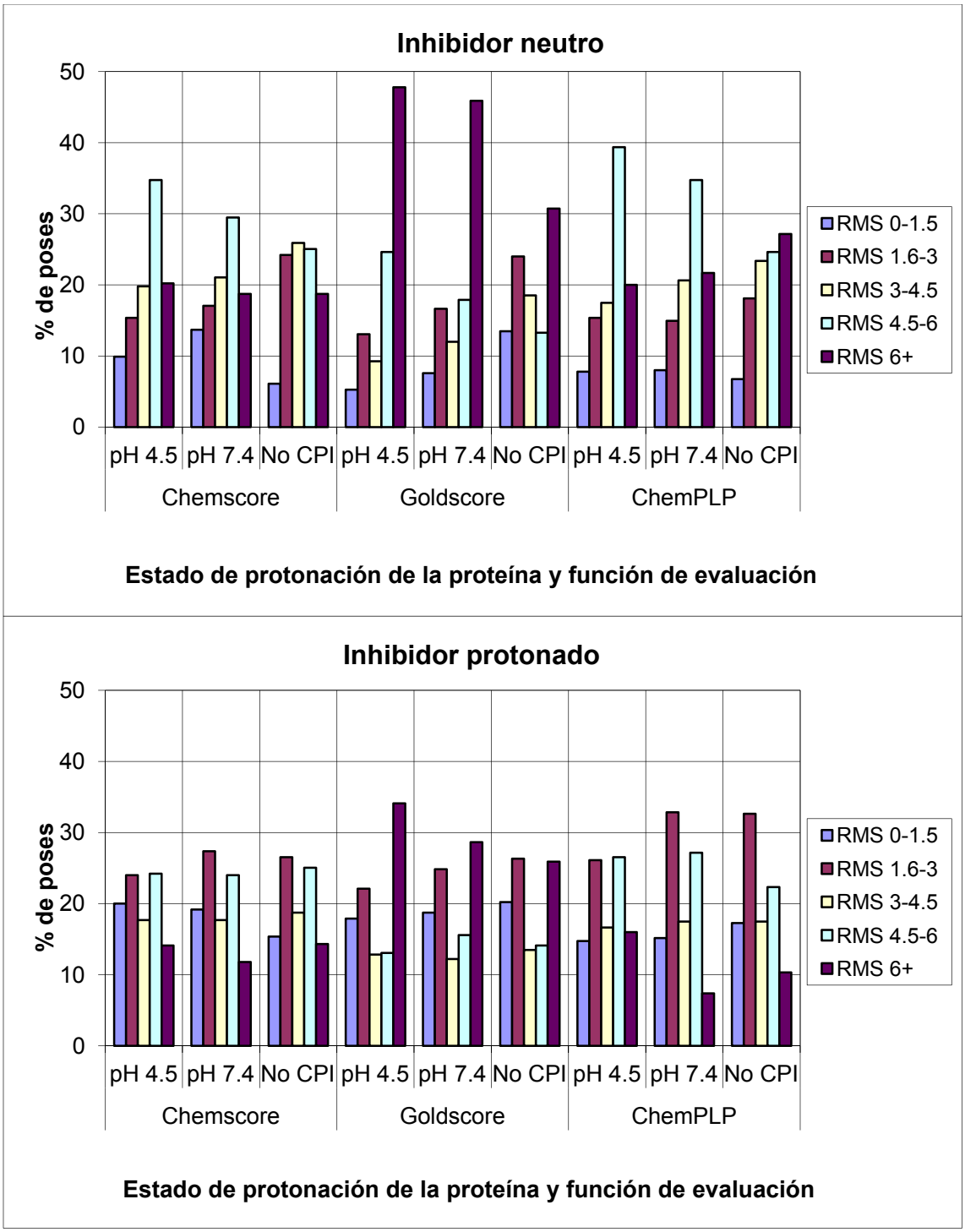


Figura 4.1.- Porcentaje de poses encontradas a un valor determinado de RMSD, resultado del cálculo de acoplamiento con las diferentes funciones de evaluación a valor de pH 4.5 y 7.4. Los cálculos indicados como "No CPI" se realizaron todos los residuos ionizables cargados.

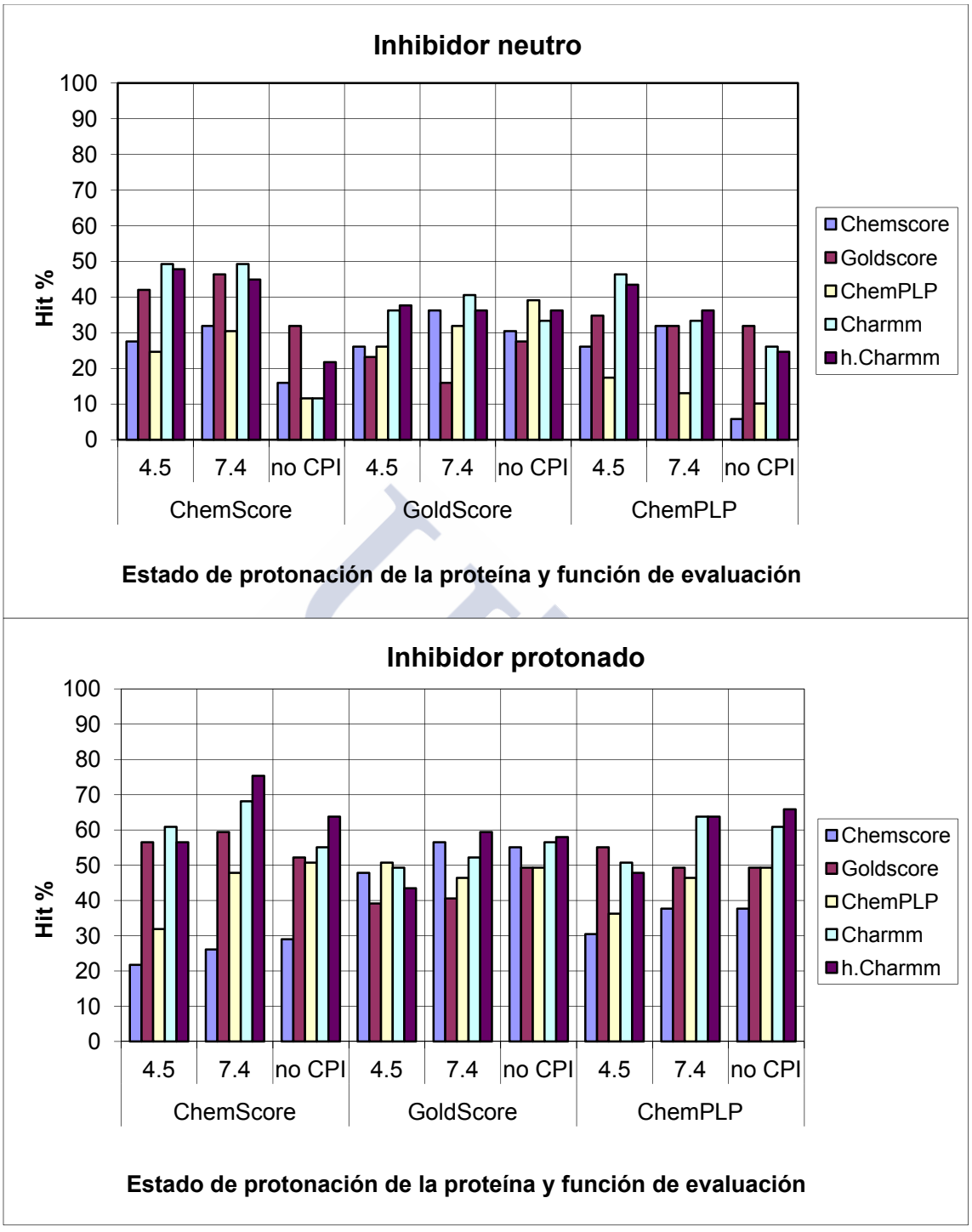


Figura 4.2.- Porcentaje de éxito en las tres posiciones mejor clasificadas tras la reevaluación con las funciones indicadas en el código de colores.

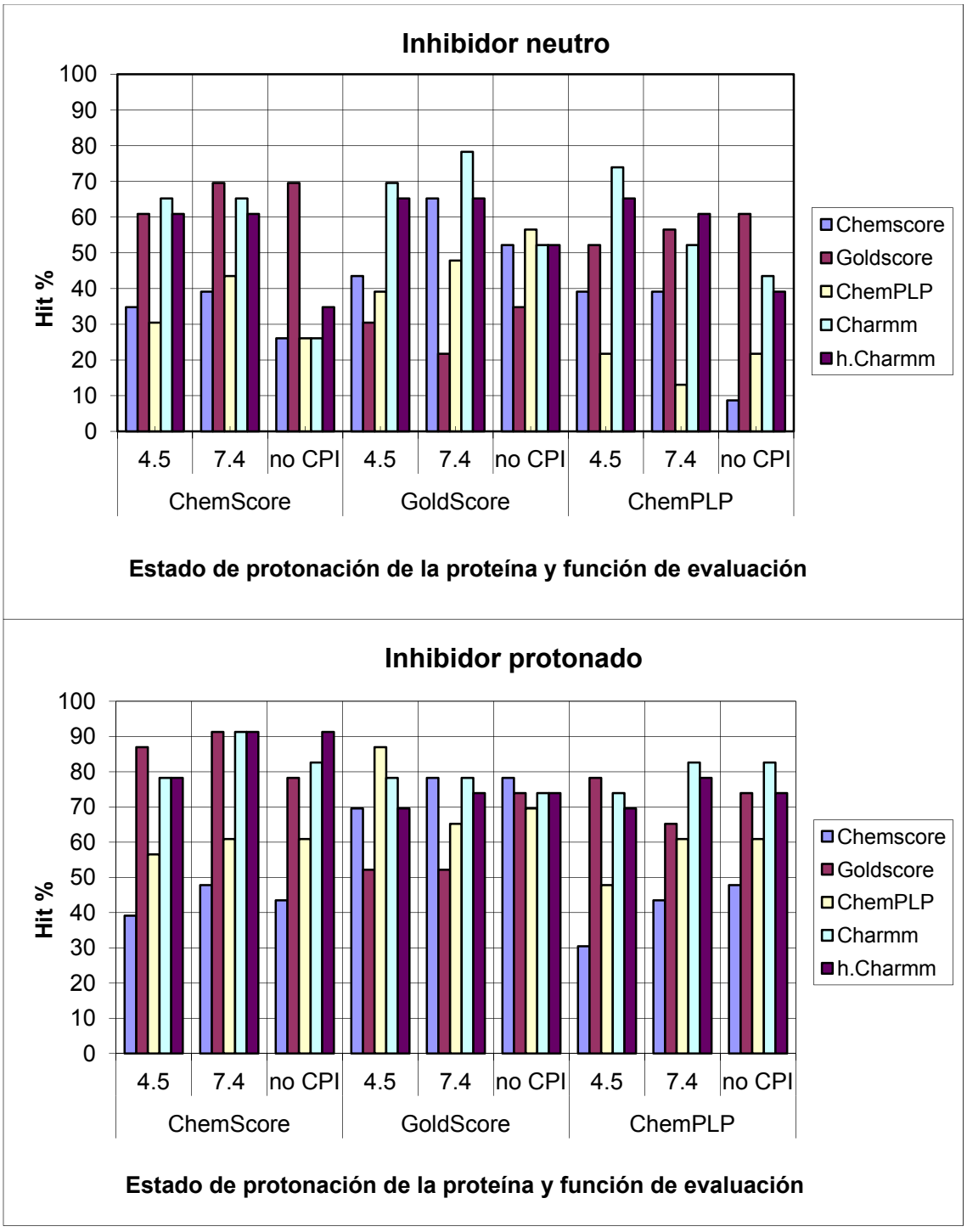


Figura 4.3.- Porcentaje de fragmentos que poseen al menos una posición con un RMSD a menos de 1.5 Å de la estructura cristalográfica entre las tres mejores según la clasificación por valor de reevaluación.

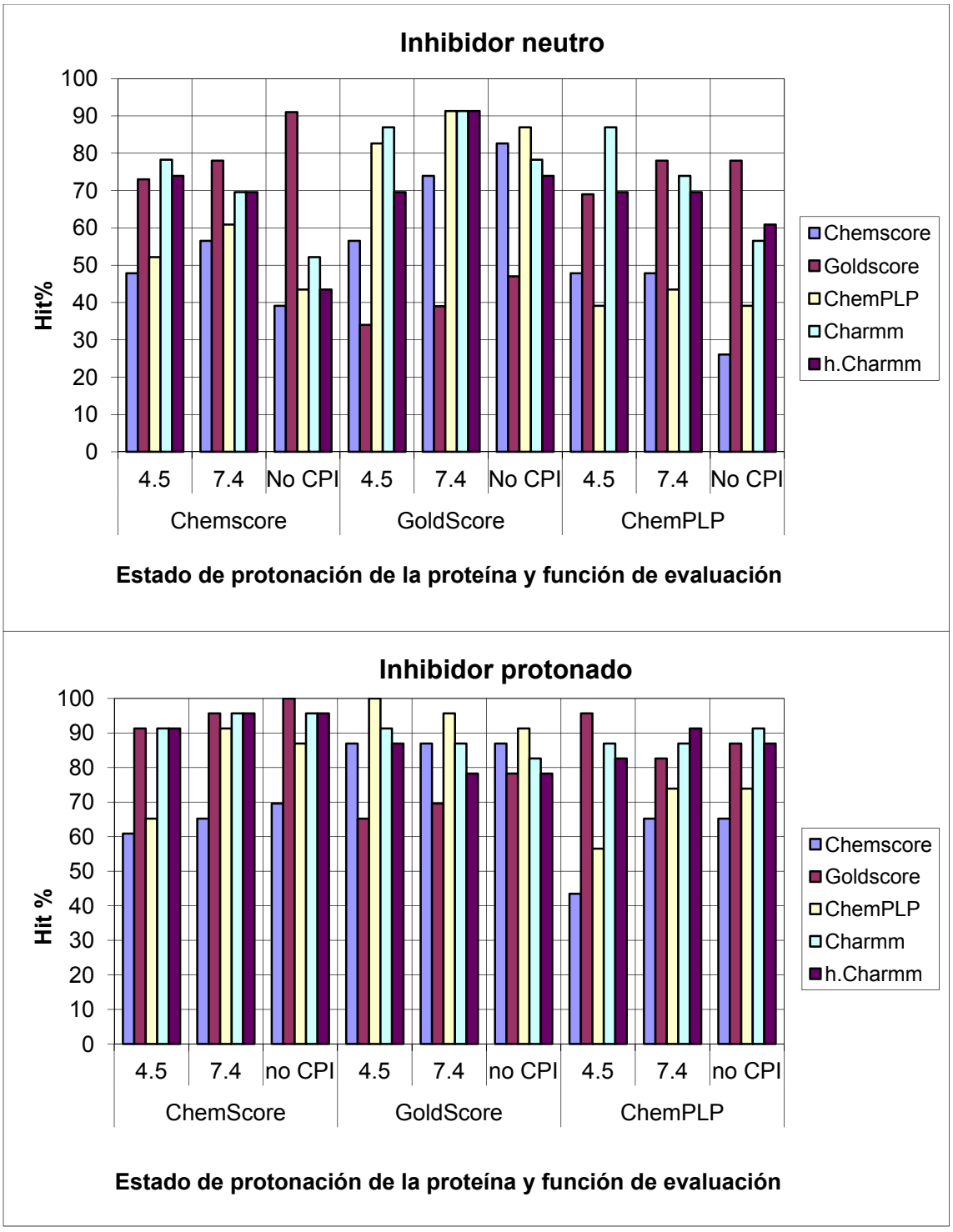


Figura 4.4.- Porcentaje de fragmentos que poseen al menos una posición con un RMSD a menos de 1.5 Å de la estructura cristalográfica entre las diez mejores según la clasificación por valor de reevaluación.

Como se observa en la Figura 4.2 (Página 78), otro factor importante en el porcentaje de éxito es la calidad de las funciones empleadas en la reevaluación. Como se ha indicado anteriormente, las funciones de evaluación presentes en GOLD (*GoldScore*, *ChemScore*, *ChemPLP*) reducen de manera significativa la influencia de interacciones electrostáticas cruciales para describir de manera completa el efecto de la carga de los residuos ácidos en la localización de la pose, ya que reemplazan las interacciones coulómbicas presentes en las aproximaciones de mecánica molecular por funciones de tipo enlace de hidrógeno. Los resultados de la Figura 4.2 muestran que las funciones de mecánica molecular son, en muchos casos, más efectivas que las funciones de evaluación originales, lo que nos indica que la representación coulómbica de la interacción electrostática es importante para incluir el efecto de la carga de los residuos ionizables en la búsqueda una pose de enlace correcta. Por lo tanto, el empleo de funciones de mecánica molecular en la generación original de poses podría incrementar en mayor medida el enriquecimiento de *hits*.

Cuando se permite una búsqueda de la pose correcta entre una mayor cantidad de candidatos mejora el porcentaje de acierto (como se observa en la comparación entre las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4), lo que nos acerca a los niveles de acierto observados en otros estudios con un número de poses seleccionadas similar.[119] Aún así, un incremento del abanico de poses reduce las diferencias de éxito de los cálculos de acoplamiento llevados a cabo a valores de pH diferentes o re-evaluados con funciones de evaluación distintas. La pérdida de precisión y capacidad de diferenciación al relajar las condiciones de selección de candidatos validaría las simulaciones llevadas a cabo con restricciones menos permisivas.

4.3.3.- Ejemplo de la dependencia de la afinidad con el pH.

La dependencia con el pH del enlace de ligandos a proteínas se ha estudiado en contadas ocasiones.[102] Para el conjunto de ligandos estudiados aquí, se ha llevado a cabo este tipo de análisis sólo en el caso de los derivados de 3H0B: 3H0B0, 3H0BM, y 3H0BS. En dicho trabajo,[102] se estudió el enlace de estos compuestos aminoheterocíclicos a pH 4.5 y 6.5. Los resultados experimentales para el derivado que contiene una función tiazol (3H0BS) indican que la afinidad observada a pH 4.5 (IC_{50} =1.1 μM) se reduce drásticamente al aumentar el pH (0% de inhibición a pH 6.5).[102] Para probar nuestro protocolo, hemos re-evaluado las 25 poses de salida de acoplamiento de este ligando a ambos valores de pH con nuestras funciones de evaluación *Charmm* y *h.Charmm*, para los dos estados de carga del inhibidor. La Figura 4.5 muestra la predicción de afinidad (ΔG_{enlace}) a ambos valores de pH para la pose con mejor valor de reevaluación. Como ve en la figura, la reevaluación basada en mecánica molecular indica que la pérdida de afinidad observada experimentalmente se reproduce en nuestros cálculos, si asumimos que al valor superior de pH el ligando se vuelve neutro. Este resultado refuerza la posibilidad de que el pK_a del ligando en solución (5.5) se mantiene cuando el ligando se enlaza con BACE-1, e indica que nuestro protocolo podría ser útil para predecir valores aproximados de pK_a del inhibidor cuando éste está unido al sitio activo de BACE-1.

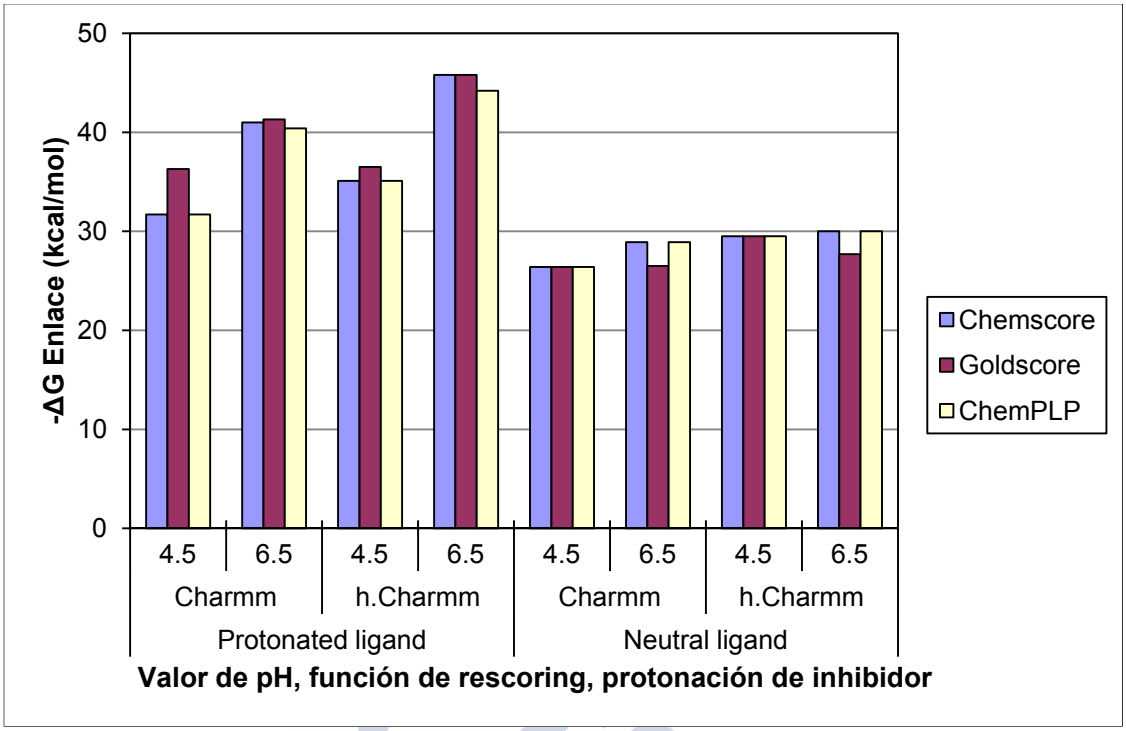


Figura 4.5.- Resultados de reevaluación (referidos como -ΔG Enlace) para las poses de acoplamiento de mejor ranking de 3H0BS, con las funciones originales de GOLD indicadas. La reevaluación se llevó a cabo para el ligando neutro y protonado a pH 4.5 y 6.5, empleando las técnicas de reevaluación de *Charmm* y *h.Charmm*.

4.3.4.- Grado de éxito de los diferentes ligandos.

El cribado de alto rendimiento de ligandos no peptídicos para BACE-1 se ha visto dificultado por varios contratiempos, debido a la naturaleza del sitio de enlace de la enzima, que incluye entre otros factores su plasticidad y su alto grado de exposición al disolvente. La Tabla 4.3 muestra los resultados de acoplamiento globales para ligandos neutros y protonados a ambos valores de pH. Para esta tabla, se emplea como definición de *hit* que al menos una de las tres mejores poses durante la reevaluación se encuentra a un valor de RMSD de 1.5 Å o menos de la estructura cristalográfica, para todas las técnicas de reevaluación y todos los valores de protonación de la proteína. Varios compuestos presentan grados de éxito favorables independientemente del estado de protonación del ligando, como 2OHN, 2VA6, o 2VA7. La tendencia general confirma lo que hemos observado en las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 (Páginas 78 a 80): la protonación del ligando incrementa las probabilidades de obtener una pose cercana a la posición cristalográfica. También hemos encontrado que el grado de éxito está visiblemente ligado a una asignación adecuada de la protonación del grupo amino en el inhibidor. Por ejemplo, la asignación de carga final empleada en el ligando 2VA5 (protonando el nitrógeno 1) mejora el ratio de *hit* total en aproximadamente un 30%, cuando se compara con los resultados obtenidos con la asignación de la protonación al nitrógeno 3, que resulta en un porcentaje de *hit* global del 17.8% (resultado no indicado). La Figura 4.6 (Página 84) ilustra la posición relativa de los dos átomos de nitrógeno del ligando en 2VA5 respecto a la díada catalítica en la estructura cristalográfica. Se puede ver cómo el nitrógeno 1 se encuentra a distancia de enlace de hidrógeno con uno de los grupos aspárticos de la díada catalítica, lo que

explicaría por qué la protonación del ligando en dicho nitrógeno mejora de manera sustancial las posibilidades de obtener *hit* comparado con la protonación del nitrógeno 3.

Tabla 4.3.- Porcentaje de *hit* a RMSD < 1.5 Å a través de los distintos protocolos.

PDB Id	% Hit según carga del ligando		
	Neutro	Protonado	Global
2OF0	17.8	55.6	36.7
2OHK	4.4	80.0	42.2
2OHL	6.7	93.3	50.0
2OHM	60.0	91.1	75.6
2OHN	80.0	97.8	88.9
2OHP	51.1	82.2	66.7
2OHS	64.4	91.1	77.8
2VA5	28.9	64.4	46.7
2VA6	84.4	82.2	83.3
2VA7	95.6	95.6	95.6
2ZJK	17.8	24.4	21.1
3BRA	17.8	37.8	27.8
3BUF	24.4	13.3	18.9
3BUG	15.6	11.1	13.3
3BUH	66.7	51.1	58.9
3KMY	66.7	91.1	78.9
3MSJ	22.2	73.3	47.8
3MSK	28.9	51.1	40.0
3MSL	55.6	91.1	73.3
3MSM	77.8	97.8	87.8
3HOB0	73.3	73.3	73.3
3HOBM	66.7	68.9	67.8
3HOBS	64.4	77.8	71.1

Un pequeño conjunto de compuestos presentan resultados globales de autoacoplamiento pobres. Es el caso de los compuestos 2ZJK, 3BRA, 3BUG, y 3BUF, cuyos porcentajes de éxito están en algunos casos por debajo del 30%. Encontrar una explicación para estos porcentajes de éxito bajo en base a su estructura química y/o el tipo de interacciones que generan con la enzima podría resultar muy valioso en el desarrollo de futuras campañas de búsqueda de ligandos de BACE-1. Estos resultados los discutiremos en detalle en el siguiente apartado.

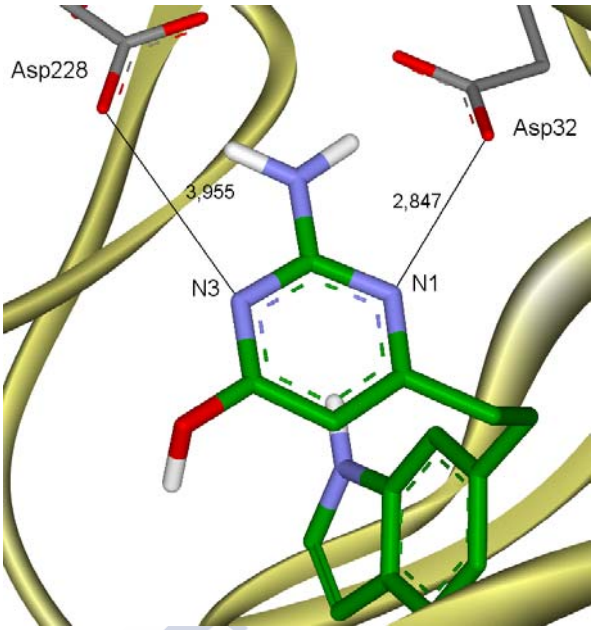


Figura 4.6.- Disposición del ligando en el complejo 2VA5.

4.4.- DISCUSIÓN.

4.4.1.- Protonación de BACE-1 y ligandos.

Muchos autores han investigado el efecto del estado de carga del inhibidor y de los residuos ácidos en el acoplamiento a BACE-1[80,118,119,120] y otras proteínas.[137] Aún así, en BACE-1 no se ha tenido en cuenta el efecto de los residuos ácidos más allá de la díada catalítica. En uno de los primeros estudios de Polgár y colaboradores[118] se investigó el efecto del estado de protonación de la díada catalítica en el cribado de ligandos de BACE-1. El cribado se realizó mediante el acoplamiento de los candidatos en una estructura de BACE-1 con asignación de carga en la díada de -1, independientemente de la naturaleza química del ligando. Como hemos demostrado anteriormente,[81] la asignación de carga de la díada aspártica catalítica depende en gran medida de la estructura química del ligando que se le une. A la vista de este resultado, las campañas de cribado de ligandos de BACE-1 deberían ser precedidas de la predicción del estado de carga de los residuos acídicos de BACE-1. Esta idea se ha incorporado recientemente a algunos estudios de cribado, autoacoplamiento, y acoplamiento cruzado de BACE-1.[119,120] Sin embargo, por lo que sabemos, nuestro trabajo es la primera ocasión en la que se ha estudiado el efecto del pH en los resultados de acoplamiento y se ha predicho el estado de protonación de todos los residuos de BACE-1 mediante el empleo de un algoritmo de cálculo de pK_a[88] antes de llevar a cabo las simulaciones de acoplamiento.

Nuestros resultados indican que aunque no hay otros residuos ácidos más allá de la díada aspártica catalítica que establecen interacción directa con el inhibidor, varios residuos de este tipo experimentan variaciones en su valor de pK_a en comparación con los obtenidos para los compuestos modelo de Asp y Glu en disolución.[81] Este resultado posiblemente se deba al

137. A.P. Graves, D.M. Shivakumar, S.E. Boyce, M.P. Jacobson, D.A. Case, B.K. Shoichet. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 914-934

microentorno que los contiene: aquellos residuos que experimentan una modificación en su pK_a hacia valores más ácidos se encuentran enterrados en un microentorno polar, mientras que aquellos que experimentan una modificación en su pK_a hacia valores más básicos se encuentran enterrados en un microentorno hidrofóbico. Además, el valor de pK_a de algunos de estos residuos ácidos (sin tener en cuenta la díada aspártica catalítica) puede variar en más de una unidad de pK_a cuando se cambia de ligando en el complejo enzima-inhibidor. Por ello, dada la naturaleza de larga distancia de las interacciones electrostáticas, el estado de carga de estos residuos ácidos puede influir en la posición de enlace de los diferentes ligandos. Para tener en cuenta estas interacciones de larga distancia, deberían considerarse funciones de evaluación que modelicen las interacciones electrostáticas (como es el caso de las funciones basadas en mecánica molecular descritas en este capítulo) incluso en la generación de poses. Como se ha mencionado previamente en la sección de resultados, nuestros cálculos muestran para algunos casos un incremento de las probabilidades de éxito cuando la totalidad del enzima se protona en función del pK_a predicho, particularmente cuando se emplean funciones de reevaluación basadas en mecánica molecular, lo que indica que las interacciones electrostáticas de largo alcance también juegan un papel a la hora de encontrar la pose correcta de enlace.

4.4.2.- Resultados de acoplamiento.

Muchos autores han elaborado hipótesis para explicar los fallos en la búsqueda y reevaluación de poses. La efectividad de los estudios de acoplamiento se ha relacionado con la afinidad del ligando por el enzima, ya que inhibidores de alta afinidad pueden ser más "fáciles" de enlazar que compuestos con energías de enlace más débiles. Otros autores han sugerido una hipótesis alternativa que relaciona la mejora del rendimiento de acoplamiento con un incremento de la eficiencia de enlace de ligando (LE) observada.[136] Estos autores marcan un punto de corte de LE de 0,4, por debajo del cual las posibilidades de bajo rendimiento de acoplamiento aumentan. Si revisamos las Tablas 4.1 y 4.3 (Páginas 67 y 83, respectivamente), podemos observar que si bien los compuestos de peor rendimiento de acoplamiento están entre los de menor afinidad de enlace, no hay una correlación directa entre rendimiento de acoplamiento y afinidad de enlace. Por otra parte, los valores experimentales para LE se encuentran en un rango entre 0,19 y 0,38, por debajo del valor de corte de 0,4 propuesto para buen rendimiento de acoplamiento. [136] De hecho, algunos de los compuestos con un valor de LE más próximo a 0,4 (3BRA, 3BUF, 3BUG) están entre los compuestos que dan peores resultados de acoplamiento.

Hemos encontrado una posible explicación estructural para los resultados de acoplamiento de estos compuestos basándonos en las interacciones proteína-ligando observadas en las estructuras cristalográficas. En algunos casos (3BRA, 3BUF, 3BUG) el grupo amina primario establece enlaces de hidrógeno con únicamente uno de los residuos de la díada catalítica, Asp32. El otro enlace de hidrógeno se observa entre la función hidroxilo del grupo fenólico y la fenilanalina Phe108. La Figura 4.7 muestra la superimposición de una de las poses de salida de valor de reevaluación más alto según *h.Charmm* con la estructura cristalográfica de 3BUG. Como se observa en dicha figura, la carencia de interacción de enlace de hidrógeno adicional con Asp228 parece que permite la rotación libre de la molécula en el sitio activo. Aunque el

RMSD de las poses mostradas aquí es de 3,3 Å aproximadamente, el patrón de enlaces de hidrógeno se reproduce adecuadamente.

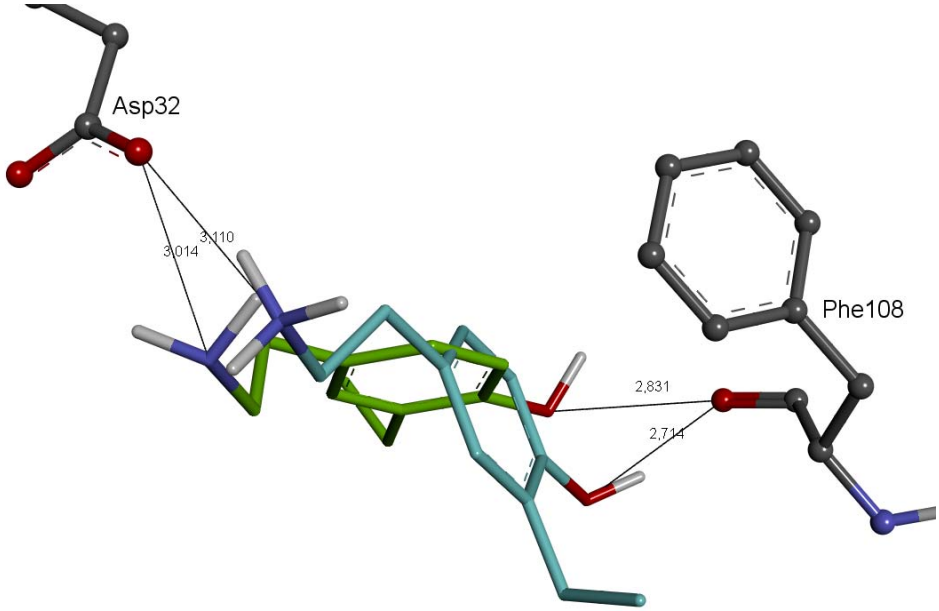


Figura 4.7. Superimposición de la posición de mayor ranking para 3BUG en *h.Charmm* (celeste) con la estructura cristalográfica (verde). Se indican los enlaces de hidrógeno en ambas estructuras.

La ausencia de motivos de enlace de hidrógeno de anclaje es más evidente en el ligando 2ZJK, ilustrado en la Figura 4.8. Este ligando no genera ningún tipo de interacción con la díada aspártica catalítica y establece un único enlace de hidrógeno con Tyr71, lo que deja el ligando con muy pocas restricciones. Este fragmento no se ha obtenido como resultado de un cribado de alto rendimiento, sino que proviene de un experimento diseñado para unir ciertas partes del ligando a la proteína mediante enlace disulfuro (un proceso conocido como "tethering").

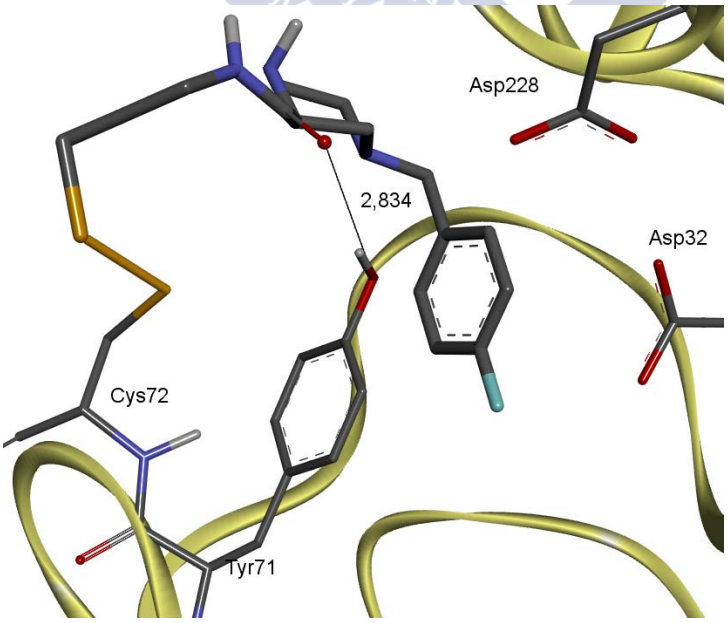


Figura 4.8. Ligando 2ZJK enlazado covalentemente con la enzima mutada en la posición 72.

Este método requiere el reemplazo de residuos individuales de la enzima por cisteínas en el sitio de enlace, seguido de un cribado de librerías de fragmentos poseedores de una función de anclaje que puedan resultar en enlaces disulfuro con la cisteína introducida en la proteína objetivo.[123] La pose cristalográfica resultante posee un enlace disulfuro enzima-ligando con el residuo 72 del *flap*, originalmente una treonina mutado a cisteína, como se puede ver en la Figura 4.8. La presencia de este enlace es importante para la generación de la conformación de ligando observada experimentalmente. Llevar a cabo simulaciones de acoplamiento sin este enlace presente reduce drásticamente el rendimiento de acoplamiento para este ligando.

Por otra parte, el incluir moléculas de agua ubicadas en el sitio activo en las estructuras cristalográficas puede ayudar a mejorar los resultados de autoacoplamiento.[138] La revisión de las estructuras cristalinas de los complejos BACE-inhibidor indica que para algunas de ellas (como 3BRA, 3BUF, 3BUG y 3BUH) se observan esta clase de moléculas de agua en el sitio activo. Dado que estas moléculas de agua interaccionan mediante enlace de hidrógeno con el único grupo amino del inhibidor (que ya ha sido anclado por uno de los aspárticos de la díada) creemos que incluir estas moléculas de agua en las simulaciones de acoplamiento no acercaría las poses calculadas a la posición observada en la estructura cristalográfica. Como se muestra en la Figura 4.9, hemos empleado el caso de 3BRA para probar esta hipótesis, en la que incluimos una molécula de agua presente en el sitio activo de la estructura cristalográfica en el proceso de acoplamiento. Los resultados en la Tabla 4.5 indican que en esta nueva ronda de cálculos el número de *hits* de RMSD < 1.5 Å apenas varía para las 25 poses, un resultado que valida nuestra suposición original.

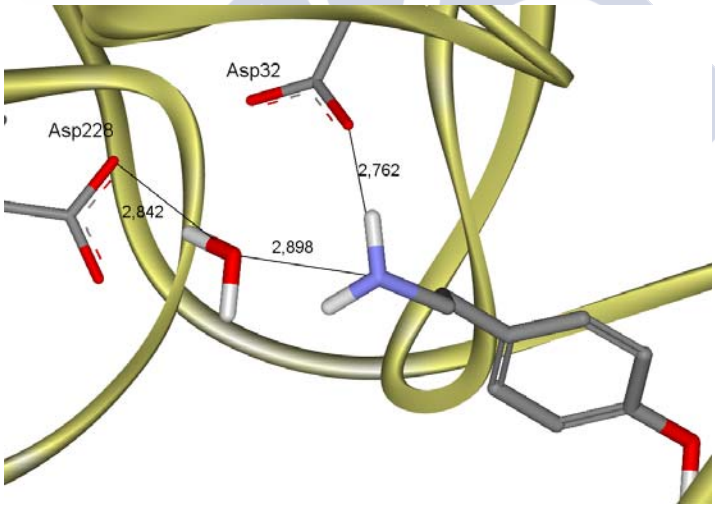


Figura 4.9.- Posición de la molécula de agua en el sitio activo del complejo 3BRA.

Nuestros resultados predicen que la mejor manera de obtener una posición cercana a la observada experimentalmente se basa en la capacidad del ligando de establecer un número elevado de enlaces de hidrógeno u otras interacciones electrostáticas con la díada aspártica catalítica y grupos funcionales polares de otros residuos cercanos al sitio activo de la proteína. Aún así, existen otras alternativas que favorecen un posicionamiento "correcto" en el acoplamiento. Así por ejemplo, para 3BUH se observan mejores resultados de acoplamiento que para 3BRA, 3BUF, y 3BUG. Una posibilidad es que el grupo ciclohexano ausente en los

138. R.Brenk, S.W. Vetter, S.E. Boyce, D.B. Goodin, B.K. Shoichet. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1449-1470

compuestos mencionados pero presente en 3BUH reduce la flexibilidad conformacional mediante colisiones estéricas que orientan la molécula hacia una posición cercana a la observada experimentalmente.

Tabla 4.5.- Número de poses adicionales con RMS < 1.5 Å (de un total de 25) que resultan en el acoplamiento de 3BRA con una molécula de agua en el sitio activo.

Ligando	Función de generación de poses	Protonación de la proteína		
		pH 4.5	pH 7.4	No CPI
Neutro	*ChemScore*	0	2	1
	GoldScore	0	0	1
	ChemPLP	0	0	0
Protonado	*ChemScore*	1	0	1
	GoldScore	0	0	1
	ChemPLP	0	0	0

Nuestros resultados indican que el mejor enriquecimiento de acoplamiento se obtiene a pH 7.4, en línea con el hecho que las estructuras originales se obtuvieron a pH neutro. Aún así, las afinidades de enlace listadas en la Tabla 4.1 (obtenidas por FRET o SPR) se obtuvieron al pH óptimo de actividad de la enzima, a pH ácido. Hemos investigado si nuestro protocolo es capaz de predecir el orden de afinidad de nuestros ligandos, al menos para aquellos en los que se dispone de información de IC_{50} a pH 4.5. La Tabla 4.6 resume los resultados, que indican que nuestro algoritmo es capaz solamente de obtener una distribución aproximada en la que aquellos ligandos con mejor afinidad se encuentran en el grupo de energía más favorable, mientras que aquellos de menor afinidad se encuentran en un grupo de energía menos favorable; la clasificación individual de los ligandos no está en línea con el orden experimental. Puede haber diversos motivos para esto, algunos de los cuales pueden estar relacionados con deficiencias a la hora de generar las poses. Creemos que los resultados podrían mejorarse con el uso de una función basada en mecánica molecular como generadora base de poses, una línea de trabajo que se está desarrollando en nuestro laboratorio.

Tabla 4.6.- Comparativa entre las salidas de energía de *h.Charmm* a pH 4.5 y valores de IC_{50}.

Ligando	ΔG (kcal/mol)			IC_{50} (μM)
	ChemScore	***GoldScore***	***ChemPLP***	
2VA7	-35.07	-33.92	-33.92	0.2
2VA6	-29.01	-29.01	-29.01	0.38
3MSL	-30.80	-29.36	-30.63	7
3MSK	-23.17	-20.48	-21.07	26
2OHS	-29.81	-23.90	-24.05	40
2OHP	-8.58	-6.01	-13.58	94
2VA5	-28.09	-29.53	-26.03	130
2OHM	-16.14	-14.91	-16.36	310
2OHN	-18.06	-14.87	-16.60	~ 500
3MSJ	-15.01	-12.10	-14.35	770
2OHK	-17.73	-18.34	-19.46	~ 2000

4.5.- CONCLUSIONES.

En resumen, en este capítulo hemos presentado un protocolo que por primera vez, para el caso de BACE-1, tiene en cuenta de manera directa el efecto del pH en el rendimiento de auto-acoplamiento en un conjunto de fragmentos precursores de inhibidor.

Los valores de pK_a de los residuos ácidos de BACE-1 en los complejos se desvían de manera sustancial de los estimados para compuestos modelos en disolución y muestran dependencia con la naturaleza química del ligando, especialmente los residuos aspárticos de la díada catalítica, un resultado que debe tenerse en cuenta a la hora de efectuar campañas de cribado de candidatos a inhibidor mediante simulaciones de acoplamiento.

La mayor influencia en el porcentaje de éxito a la hora de encontrar la pose viene dada por la asignación de carga del inhibidor y la elección de valor de pH del entorno. El enriquecimiento que se observa al asignar una carga positiva al inhibidor es el resultado probable de un micro-entorno polar creado en parte por la díada aspártica catalítica, que permite a la función ionizable del inhibidor conservar o incrementar su valor de pK_a predicho en disolución. En el caso del ligando 3H0BS, hemos demostrado que nuestros cálculos nos permiten predecir de manera aproximada un valor de pK_a para su función ionizable, y en algunos otros casos nuestro protocolo ha permitido identificar el átomo N más susceptible de protonación en el inhibidor.

Como se ha visto en nuestros resultados, la mayor frecuencia de éxito se obtiene a pH cercano al neutro. Este es un reultado razonable, y soporta nuestra asignación de pK_a ya que las poses observadas (obtenidas por cristalografía de rayos X) se han obtenido a este valor de pH. Aún así, la mayoría de ensayos de enlace de inhibidor con BACE-1 se llevan a cabo a pH ácido, el óptimo para la actividad de la enzima. Los resultados preliminares indican que a pH ácido (4.5) nuestro protocolo agrupa los mejores inhibidores observados experimentalmente en la parte superior de la clasificación, y los peores en la parte inferior.

Nuestros cálculos en BACE-1 ligada a fragmentos indican que a pH 4.5 el estado de carga de la díada más prevalente es el monoprotonado, con el protón ubicado en Asp32. De cualquier modo, como muestra la Tabla 4.2 y los resultados del capítulo anterior,[81] existen otras posibilidades. Por ello, una opción capaz de enriquecer los resultados de salida podría basarse en simulaciones de acoplamiento del conjunto con un set de proteínas que contienen los estados de protonación más comúnmente predichos para la díada aspártica catalítica y que incluyan el estado de protonación de los demás residuos a pH 4.5. Este barrido de poses se llevaría a cabo con protocolos basados en mecánica molecular para permitir la flexibilidad de los residuos del sitio activo (como las restricciones armónicas empleadas en la técnica de reevaluación de *h.Charmm*), lo que a su ver incrementaría la frecuencia de éxito.

Finalmente, hemos encontrado una posible explicación para el pobre rendimiento de acoplamiento para algunos ligandos, independientemente del protocolo empleado. Los resultados indican que los compuestos que presentan un comportamiento peor tienen pocas interacciones de anclaje, carentes de enlaces de hidrógeno con uno o ambos ácidos aspárticos. Este resultado podría emplearse en campañas de cribado para descartar fragmentos que no lleguen a un mínimo de interacciones de anclaje y por tanto puedan producir falsos negativos.

Los resultados presentados en este capítulo se pueden encontrar en la siguiente publicación:

J.L. Dominguez, M.C. Villaverde, F. Sussman. *J. Comp. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 403-417.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.6.- Anexo. Tabla 4.7.a.- Valores de p*Ka* de los residuos ácidos de la proteína. Inhibidores neutros.

Residuo	2OF0	2OHK	2OHL	2OHM	2OHN	2OHP	2OHS	2VA5	2VA6	2VA7	2ZJK	3BRA
ASP4	4.7	4.5	4.7	4.4	4.5	3.9	4.0	4.3	4.8	4.6	3.9	3.7
ASP32	8.6	8.8	8.3	6.6	6.4	9.5	7.3	8.7	8.4	8.8	6.2	6.5
ASP62	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	3.1	3.4	3.1	3.2	3.1	3.3	2.8
ASP83	4.8	4.8	4.7	4.2	3.8	4.8	4.8	4.4	4.4	4.4	4.1	4.5
ASP106	3.0	3.2	3.1	3.0	3.1	3.3	3.1	3.2	3.0	2.8	3.3	2.8
ASP130	3.2	3.6	3.2	3.3	3.4	3.2	3.3	3.2	3.5	3.4	3.5	3.4
ASP131	3.6	3.4	3.6	3.4	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.5
ASP138	3.5	3.5	3.4	3.4	3.5	3.5	3.9	3.5	3.5	3.4	3.4	3.3
ASP180	3.6	3.8	3.9	3.6	3.7	3.9	3.5	3.8	3.6	3.2	3.4	3.5
ASP212	2.5	2.7	2.7	2.7	2.3	2.8	2.4	2.7	2.2	2.6	2.6	2.6
ASP216	3.5	3.2	3.5	3.5	3.5	3.3	3.2	3.0	3.3	3.1	3.2	3.2
ASP223	3.7	3.7	3.5	3.8	3.6	3.7	3.4	3.8	3.6	3.5	3.5	3.3
ASP228	6.4	5.1	5.7	8.1	4.5	5.9	7.8	5.3	5.8	5.8	4.8	4.7
ASP259	3.1	3.0	3.0	3.0	2.9	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0
ASP311	4.1	4.1	3.8	3.7	3.9	4.1	3.6	3.5	3.5	3.4	3.7	3.9
ASP317	4.0	3.9	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	3.8	4.5	4.3	4.1	3.8
ASP318	4.5	4.7	4.6	4.5	4.9	4.7	4.5	4.5	4.4	4.4	4.8	4.7
ASP346	4.3	4.3	4.4	4.2	4.0	4.4	3.8	4.0	3.9	4.4	4.4	3.7
ASP363	3.1	3.9	3.1	3.0	3.6	4.0	3.7	3.3	3.4	3.3	3.7	3.7
ASP378	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.9	4.0	3.8	3.9	3.9	3.7
ASP381	3.7	3.9	3.8	4.1	3.6	3.7	3.6	3.8	3.9	3.6	3.8	3.7
GLU1	3.6	4.7	4.4	3.4	4.5	4.8	3.5	3.6	4.5	4.4	3.2	4.4
GLU17	4.3	4.2	4.3	4.3	4.3	4.4	4.3	4.4	4.2	4.2	4.1	4.4
GLU77	4.7	4.8	5.1	4.8	5.0	4.9	4.6	4.5	5.1	5.4	4.8	4.8
GLU79	3.9	4.0	4.1	4.3	4.0	4.0	5.6	4.2	4.0	3.9	4.1	4.0
GLU104	3.6	3.5	3.5	3.4	3.5	3.4	3.4	3.5	3.5	3.7	4.3	4.2
GLU116	5.1	5.9	4.8	4.6	4.9	5.0	5.2	4.8	5.2	5.3	5.8	5.4
GLU125	4.7	4.3	4.3	4.3	4.8	4.3	4.6	4.5	4.4	4.4	4.2	4.4
GLU134	4.7	5.1	4.7	5.9	5.0	5.1	5.5	6.0	5.3	5.1	5.3	5.1
GLU165	4.9	5.0	4.9	5.0	4.9	4.9	4.7	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9
GLU196	3.9	3.9	4.0	4.1	4.0	3.9	4.1	4.1	4.0	3.8	4.3	3.9
GLU200	5.6	5.8	5.6	5.8	5.6	5.9	5.7	5.5	5.8	5.7	5.5	5.8
GLU207	5.1	5.3	5.6	5.4	4.5	5.1	5.2	5.4	4.8	4.5	4.5	4.6
GLU219	4.5	4.6	4.5	4.4	4.7	4.8	4.8	4.9	4.6	4.6	4.4	5.9
GLU242	4.3	4.2	4.1	4.0	4.0	3.9	4.4	3.9	4.0	4.1	4.0	4.0
GLU255	5.1	5.1	5.2	5.2	4.9	4.9	5.5	5.1	5.0	5.2	5.3	5.3
GLU265	4.5	4.5	4.5	4.4	4.5	4.4	4.5	4.5	4.4	4.5	4.4	4.3
GLU290	4.7	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.7	4.6	4.6
GLU310	4.8	5.4	4.7	5.4	6.0	5.1	5.9	5.5	4.6	5.2	5.0	5.2
GLU339	7.0	6.7	6.5	6.6	6.6	6.0	6.5	6.4	6.7	6.9	6.4	6.0
GLU364	4.4	4.2	4.3	4.3	4.4	4.4	4.6	4.3	4.2	4.3	4.3	4.3
GLU371	4.4	4.3	4.5	4.3	4.3	4.3	4.0	4.2	4.4	4.4	4.1	4.2
GLU380	4.6	4.5	4.5	4.4	4.5	4.6	4.5	4.4	4.6	4.2	4.4	4.6

Tabla 4.7.a. (cont)

Residuo	3BUF	3BUG	3BUH	3KMY	3MSJ	3MSK	3MSL	3MSM	3H0B0	3H0BM	3H0BS
ASP4	3.6	3.7	3.4	4.5	3.9	3.6	3.7	4.4	3.9	3.9	3.9
ASP32	7.0	6.5	7.0	7.2	9.0	8.4	8.1	8.6	6.8	7.8	7.8
ASP62	2.8	3.1	2.9	3.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.5	3.5	3.5
ASP83	4.5	4.5	4.5	4.7	5.0	4.9	4.7	4.6	5.2	5.2	5.2
ASP106	2.8	2.9	2.8	2.9	3.1	3.1	3.2	3.0	2.8	2.8	2.8
ASP130	3.3	3.4	3.3	3.3	3.3	3.1	3.3	3.5	3.7	3.7	3.7
ASP131	3.4	3.5	3.4	3.4	3.6	3.5	3.5	3.4	3.6	3.6	3.6
ASP138	3.3	3.4	3.3	3.8	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ASP180	3.4	3.5	3.5	3.5	3.6	3.4	3.5	3.4	3.6	3.6	3.6
ASP212	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	2.6	2.5	2.7	2.9	2.9	2.9
ASP216	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.2	3.4	3.0	3.0	3.0
ASP223	3.3	3.1	3.2	3.4	3.4	3.5	3.6	3.5	3.3	3.3	3.3
ASP228	4.7	5.1	5.0	8.4	6.7	6.0	6.0	6.0	7.0	6.9	6.7
ASP259	3.0	3.0	3.0	2.9	3.1	2.9	3.1	2.9	3.0	3.0	3.0
ASP311	3.3	3.7	3.8	3.2	3.7	3.2	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
ASP317	4.2	3.9	3.9	4.6	4.4	4.1	3.9	3.6	4.4	4.4	4.4
ASP318	5.1	5.5	5.2	4.6	4.6	4.6	4.7	4.5	4.9	4.9	4.8
ASP346	3.9	3.9	3.9	4.4	4.5	4.1	3.6	3.9	4.4	4.4	4.4
ASP363	4.2	4.3	3.3	3.3	3.5	3.6	3.3	3.4	3.5	3.5	3.5
ASP378	3.7	3.8	3.8	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	4.0	4.0	4.0
ASP381	3.7	3.8	3.7	4.0	3.7	3.5	4.0	3.8	3.5	3.5	3.5
GLU1	3.0	3.0	2.9	4.2	2.9	4.3	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
GLU17	4.3	4.3	4.1	4.2	6.4	4.1	4.3	4.0	4.2	4.2	4.2
GLU77	4.8	4.7	4.8	5.1	4.5	5.3	4.8	4.8	4.3	4.3	4.3
GLU79	4.0	3.8	4.0	4.4	4.2	4.0	5.2	4.0	5.4	5.3	5.3
GLU104	4.2	4.1	4.1	4.3	4.2	3.9	3.7	3.6	4.2	4.2	4.2
GLU116	5.3	5.9	6.1	6.0	6.2	5.7	5.2	6.2	5.9	5.9	5.9
GLU125	4.4	4.5	4.5	4.5	4.0	4.4	4.3	4.7	4.4	4.4	4.4
GLU134	5.2	5.0	5.2	5.4	5.3	5.3	5.1	5.1	4.5	4.5	4.5
GLU165	4.8	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.8	4.6	5.0	5.0	5.0
GLU196	4.0	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
GLU200	5.5	5.8	5.7	5.4	5.7	5.5	5.4	5.5	5.6	5.6	5.6
GLU207	4.6	4.8	4.9	4.6	4.7	5.0	5.1	5.4	5.0	5.0	5.0
GLU219	6.0	5.7	6.2	4.2	4.5	4.5	4.5	4.7	4.8	4.8	4.8
GLU242	4.1	4.2	4.1	4.0	4.3	4.0	4.2	3.9	4.6	4.6	4.6
GLU255	5.1	5.1	5.6	5.0	5.5	5.1	5.2	5.4	5.7	5.7	5.7
GLU265	4.3	4.3	4.4	4.2	4.4	4.4	4.5	4.5	4.4	4.3	4.3
GLU290	4.6	4.7	4.6	4.8	4.7	4.7	4.6	4.7	5.1	5.1	5.1
GLU310	5.1	4.9	5.0	4.8	5.0	4.9	3.4	5.0	5.1	5.1	5.1
GLU339	6.0	6.2	6.2	6.7	7.0	6.4	6.0	5.8	6.4	6.4	6.4
GLU364	4.4	4.5	4.4	4.6	4.6	4.5	4.5	4.4	4.4	4.4	4.4
GLU371	4.2	4.0	4.2	4.3	4.2	4.0	4.4	4.0	4.1	4.1	4.1
GLU380	4.6	4.6	4.6	4.6	4.8	4.4	4.6	4.4	4.6	4.6	4.6

Tabla 4.7.b.- Valores de p*Ka* de los residuos ácidos de la proteína. Inhibidores protonados.

Residuo	2OF0	2OHK	2OHL	2OHM	2OHN	2OHP	2OHS	2VA5	2VA6	2VA7	2ZJK	3BRA
ASP4	4.7	4.6	4.7	4.4	4.5	3.9	4.0	4.3	4.8	4.5	3.9	3.7
ASP32	6.4	4.0	3.5	5.2	5.9	5.7	7.2	5.7	5.9	6.1	6.1	4.2
ASP62	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	3.1	3.4	3.1	3.2	3.1	3.3	2.8
ASP83	4.8	4.7	4.7	4.2	3.8	4.8	4.8	4.4	4.4	4.4	4.1	4.5
ASP106	2.9	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2	3.1	3.1	2.9	2.7	3.3	2.7
ASP130	3.2	3.6	3.2	3.3	3.4	3.2	3.3	3.2	3.5	3.3	3.5	3.4
ASP131	3.5	3.4	3.5	3.4	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.4
ASP138	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.4	3.9	3.5	3.4	3.4	3.4	3.3
ASP180	3.6	3.8	4.0	3.6	3.7	3.9	3.5	3.8	3.6	3.1	3.4	3.5
ASP212	2.5	2.7	2.7	2.6	2.3	2.8	2.4	2.7	2.2	2.6	2.6	2.6
ASP216	3.5	3.2	3.5	3.5	3.5	3.3	3.2	3.0	3.3	3.1	3.2	3.2
ASP223	3.6	3.7	3.5	3.8	3.6	3.6	3.4	3.8	3.5	3.5	3.5	3.2
ASP228	4.2	4.3	6.0	4.4	2.9	5.3	4.3	4.1	3.8	3.9	4.6	5.2
ASP259	3.1	3.0	3.0	3.0	2.9	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0
ASP311	4.1	4.1	3.8	3.6	3.9	4.1	3.6	3.5	3.5	3.4	3.7	3.9
ASP317	4.0	3.9	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	3.8	4.5	4.3	4.1	3.8
ASP318	4.5	4.7	4.6	4.5	4.9	4.7	4.5	4.5	4.4	4.4	4.7	4.7
ASP346	4.3	4.3	4.4	4.2	4.1	4.4	3.8	3.9	3.9	4.4	4.4	3.6
ASP363	3.1	3.9	3.1	3.0	3.6	4.0	3.7	3.3	3.4	3.3	3.6	3.7
ASP378	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.9	4.0	3.8	3.9	3.9	3.7
ASP381	3.7	3.9	3.8	4.1	3.6	3.7	3.6	3.8	3.9	3.6	3.8	3.7
GLU1	3.6	4.7	4.4	3.4	4.5	4.8	3.5	3.6	4.5	4.4	3.2	4.4
GLU17	4.3	4.2	4.3	4.3	4.3	4.4	4.3	4.4	4.2	4.2	4.1	4.4
GLU77	4.7	4.8	5.1	4.8	5.0	4.9	4.6	4.4	5.1	5.4	4.8	4.7
GLU79	3.9	4.0	4.1	4.3	4.0	4.0	5.6	4.2	3.9	3.9	4.1	4.0
GLU104	3.6	3.5	3.5	3.4	3.5	3.3	3.4	3.5	3.5	3.7	4.3	4.2
GLU116	5.1	5.9	4.8	4.6	4.9	4.9	5.2	4.8	5.2	5.3	5.8	5.3
GLU125	4.6	4.3	4.3	4.3	4.8	4.3	4.6	4.5	4.4	4.4	4.2	4.4
GLU134	4.7	5.1	4.7	5.9	5.0	5.1	5.5	6.0	5.3	5.1	5.3	5.1
GLU165	4.9	5.0	4.9	5.0	4.9	4.9	4.7	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9
GLU196	3.9	3.9	4.0	4.1	4.0	3.9	4.1	4.1	4.0	3.8	4.3	3.9
GLU200	5.6	5.8	5.6	5.9	5.6	5.9	5.7	5.5	5.8	5.7	5.5	5.8
GLU207	5.1	5.3	5.6	5.4	4.5	5.1	5.2	5.4	4.8	4.5	4.5	4.6
GLU219	4.5	4.6	4.5	4.4	4.7	4.8	4.7	4.9	4.6	4.6	4.4	5.9
GLU242	4.3	4.2	4.0	4.0	4.0	3.9	4.4	3.9	4.0	4.1	4.0	4.0
GLU255	5.1	5.1	5.2	5.2	4.9	4.9	5.5	5.1	5.0	5.2	5.3	5.3
GLU265	4.5	4.5	4.4	4.4	4.5	4.4	4.5	4.5	4.4	4.5	4.3	4.3
GLU290	4.7	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.7	4.6	4.6
GLU310	4.8	5.4	4.7	5.4	6.0	5.0	5.9	5.5	4.6	5.2	4.9	5.2
GLU339	7.0	6.7	6.5	6.6	6.6	6.0	6.5	6.4	6.7	6.9	6.3	6.0
GLU364	4.4	4.2	4.3	4.3	4.4	4.4	4.6	4.2	4.2	4.3	4.3	4.3
GLU371	4.4	4.3	4.5	4.3	4.3	4.3	4.0	4.2	4.4	4.4	4.1	4.2
GLU380	4.6	4.5	4.5	4.4	4.5	4.6	4.5	4.4	4.6	4.2	4.4	4.6

Tabla 4.7.b. (cont)

Residuo	3BUF	3BUG	3BUH	3KMY	3MSJ	3MSK	3MSL	3MSM	3H0B0	3H0BM	3H0BS
ASP4	3.6	3.7	3.4	4.5	3.9	3.6	3.7	4.3	3.9	3.9	3.9
ASP32	4.5	4.4	4.5	7.2	6.2	5.3	5.6	5.6	5.2	5.2	4.6
ASP62	2.8	3.1	2.9	3.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.5	3.5	3.5
ASP83	4.5	4.5	4.5	4.7	5.0	4.9	4.7	4.6	5.2	5.2	5.3
ASP106	2.7	2.8	2.7	2.9	3.0	3.0	3.2	2.9	2.7	2.7	2.7
ASP130	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.1	3.3	3.4	3.7	3.7	3.7
ASP131	3.4	3.5	3.4	3.4	3.6	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5
ASP138	3.3	3.4	3.3	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4
ASP180	3.4	3.5	3.4	3.5	3.6	3.4	3.5	3.4	3.6	3.6	3.6
ASP212	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	2.6	2.5	2.7	2.9	2.9	2.9
ASP216	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.1	3.4	3.0	3.0	3.0
ASP223	3.2	3.0	3.1	3.4	3.3	3.5	3.5	3.5	3.2	3.2	3.2
ASP228	5.4	5.7	5.7	3.7	5.0	4.3	3.9	3.9	5.6	5.7	5.3
ASP259	3.0	3.0	3.0	2.9	3.1	2.9	3.1	2.9	3.0	3.0	3.0
ASP311	3.3	3.7	3.8	3.2	3.7	3.2	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
ASP317	4.2	3.9	3.9	4.6	4.4	4.1	3.9	3.6	4.4	4.4	4.4
ASP318	5.1	5.5	5.2	4.6	4.6	4.6	4.7	4.5	4.9	4.9	4.9
ASP346	3.8	3.8	3.9	4.4	4.5	4.1	3.6	3.9	4.4	4.4	4.4
ASP363	4.2	4.3	3.3	3.3	3.5	3.6	3.3	3.4	3.5	3.5	3.5
ASP378	3.7	3.8	3.8	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	4.0	4.0	4.0
ASP381	3.7	3.8	3.7	4.0	3.7	3.4	4.0	3.8	3.5	3.5	3.5
GLU1	3.0	3.0	2.9	4.2	2.9	4.3	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
GLU17	4.3	4.2	4.1	4.2	6.4	4.1	4.3	4.0	4.2	4.2	4.2
GLU77	4.8	4.7	4.8	5.1	4.5	5.3	4.8	4.8	4.3	4.2	4.2
GLU79	4.0	3.8	3.9	4.4	4.2	4.0	5.2	4.0	5.4	5.4	5.4
GLU104	4.2	4.1	4.1	4.3	4.2	3.9	3.6	3.5	4.1	4.1	4.2
GLU116	5.3	5.9	6.1	6.0	6.2	5.7	5.2	6.2	6.0	6.0	6.0
GLU125	4.4	4.4	4.4	4.5	4.0	4.4	4.3	4.7	4.4	4.4	4.4
GLU134	5.2	5.0	5.2	5.4	5.2	5.3	5.1	5.1	4.5	4.5	4.5
GLU165	4.8	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.8	4.6	5.0	5.0	5.0
GLU196	3.9	3.9	4.0	3.9	4.0	3.9	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
GLU200	5.4	5.8	5.7	5.4	5.7	5.5	5.4	5.5	5.6	5.6	5.6
GLU207	4.6	4.8	4.9	4.6	4.7	5.0	5.1	5.4	5.0	5.0	5.0
GLU219	6.0	5.7	6.2	4.2	4.4	4.5	4.5	4.7	4.8	4.8	4.8
GLU242	4.1	4.2	4.1	4.0	4.3	4.0	4.2	3.9	4.6	4.6	4.6
GLU255	5.1	5.1	5.6	5.0	5.5	5.1	5.2	5.4	5.7	5.7	5.7
GLU265	4.3	4.3	4.4	4.2	4.4	4.4	4.5	4.5	4.3	4.3	4.3
GLU290	4.6	4.7	4.6	4.8	4.6	4.7	4.6	4.7	5.1	5.1	5.1
GLU310	5.1	4.9	5.0	4.8	5.0	4.9	3.4	5.0	5.1	5.1	5.1
GLU339	6.0	6.1	6.2	6.7	7.0	6.4	6.1	5.8	6.4	6.4	6.4
GLU364	4.4	4.5	4.4	4.6	4.6	4.5	4.5	4.4	4.4	4.4	4.4
GLU371	4.2	4.0	4.2	4.3	4.2	4.0	4.4	4.0	4.1	4.1	4.1
GLU380	4.6	4.6	4.6	4.6	4.8	4.4	4.6	4.4	4.6	4.6	4.6

CAPÍTULO 5.

BÚSQUEDA DE CABEZAS DE SERIE MULTIDIANA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1.- INTRODUCCIÓN.

El principal objetivo de esta tesis es la búsqueda de de candidatos a fármacos que se puedan unir con buena afinidad a la mayoría de dianas farmacológicas de la cascada amiloide. El hallazgo de compuestos multidiana tendría muchos beneficios, entre ellos la redución de la toxicidad presente en los tratamientos multifármaco que se necesitarían para atacar todas las dianas de la cascada amiloide. Sin embargo, el descubrimiento de compuestos multidiana en el contexto de la cascada amiloide presenta importantes dificultades, si se consideran las diferencias sustanciales existentes entre los sitios de enlace de las dianas. Para solventar este problema de una manera metódica, hemos diseñado un protocolo de búsqueda basado en un farmacóforo que combine los requerimientos estructurales necesarios para la interacción con las diferentes dianas farmacológicas.

Como se ha visto en el capítulo 3, ya habíamos propuesto un farmacóforo altamente simplificado para candidatos a inhibidor que no sólo tengan una buena afinidad por BACE-1 a nivel enzimático sino también a nivel celular. Esta estructura básica se derivó de nuestros estudios del efecto del pH sobre la afinidad de inhibidores de BACE-1, en los que habíamos observado que aquellos ligandos que poseen buenas afinidades a ambos valores de pH (ácido y neutro) son los que presentan buena actividad celular.[81] Una posible explicación se halla en que el inhibidor se une a BACE-1 en la superficie de la membrana celular, en un entorno de pH neutro, para después ser cotransportado con la enzima hasta los endosomas, cuyo pH se encuentra en el rango ácido al cual la actividad catalítica es óptima para esta enzima. Para que este proceso de cotransporte e internalización de ligando sea efectivo, la afinidad de éste por la enzima debería ser igualmente elevada a ambos valores de pH. Nuestros resultados (ver Capítulo 3) indican que esto se logra cuando los candidatos a inhibidor inducen el mismo estado de protonación en la díada aspártica a pH neutro y ácido, como es el caso de las hidroxietilaminas que interaccionan con los residuos de ácido aspártico de la díada catalítica tal y como se muestra en la Figura 5.1. El patrón de interacciones mostrado en el Esquema 5.1 se podría emplear como farmacóforo en la búsqueda de cabezas de serie para la inhibición de BACE-1.

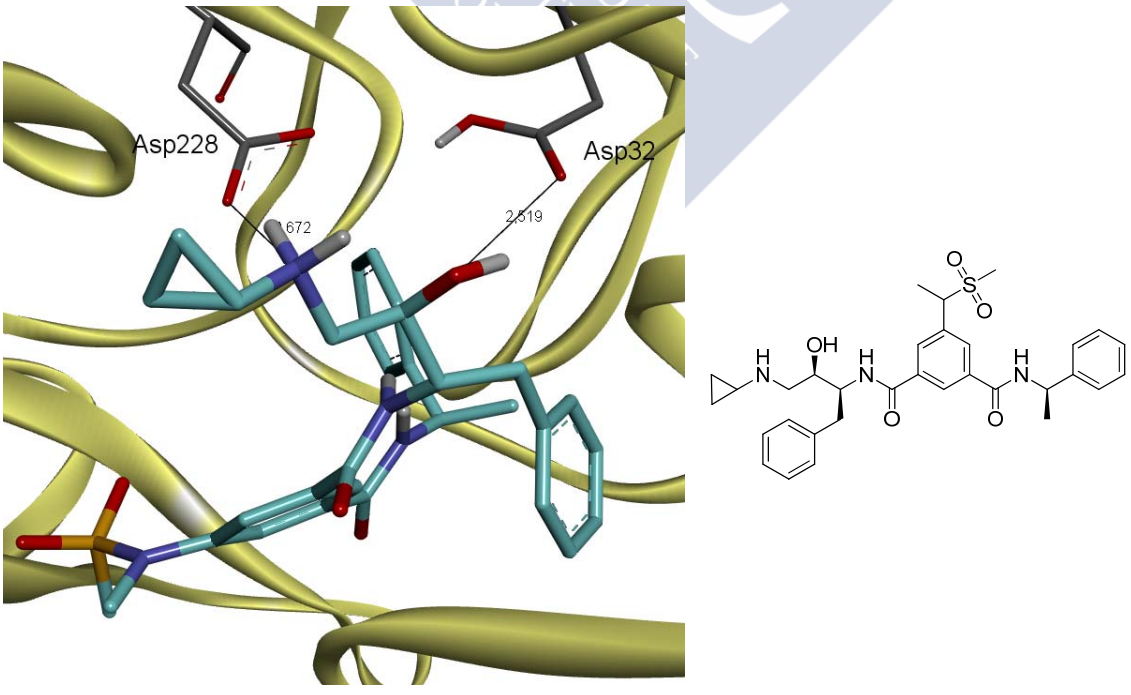
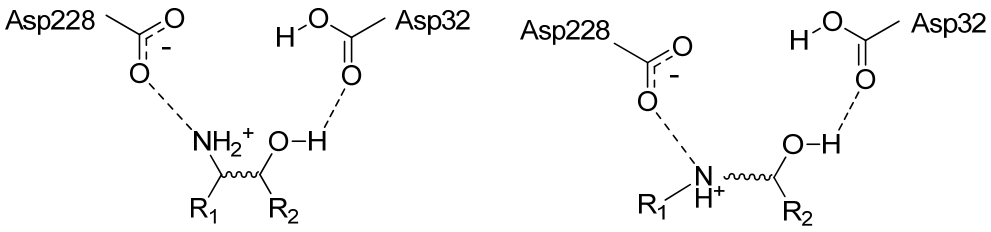


Figura. 5.1.- Contactos del motivo hidroxietilamina del inhibidor indicado en la parte derecha de la figura con la díada aspártica catalítica en su complejo con BACE-1 (PDB id. 2B8L).



Esquema 5.1.- Dos posibles configuraciones del farmacóforo propuesto para la interacción multidiana.

Un análisis visual del modo de enlace de los inhibidores de las otras dianas de la cascada amiloide indica que un motivo común de interacción ligando proteína en AChE y péptido-ligando en los péptidos amiloides son los contactos de apilamiento π entre las cadenas laterales aromáticas de las dianas y los fragmentos aromáticos de los ligandos. La Figura 5.2 (ya introducida en el capítulo 1) detalla las interacciones de un análogo de la *bis*-tarcrina con algunos residuos aromáticos de AChE en el sitio aniónico catalítico (Catalytic Anionic Site, CAS) y periférico (Peripheral Anionic Site, PAS), obtenida de la estructura cristalográfica del complejo. Como muestra dicha figura, para alcanzar ambos sitios de enlace con un único inhibidor, se necesita que los grupos aromáticos estén unidos por un espaciador de tamaño óptimo que llegue del PAS al CAS.

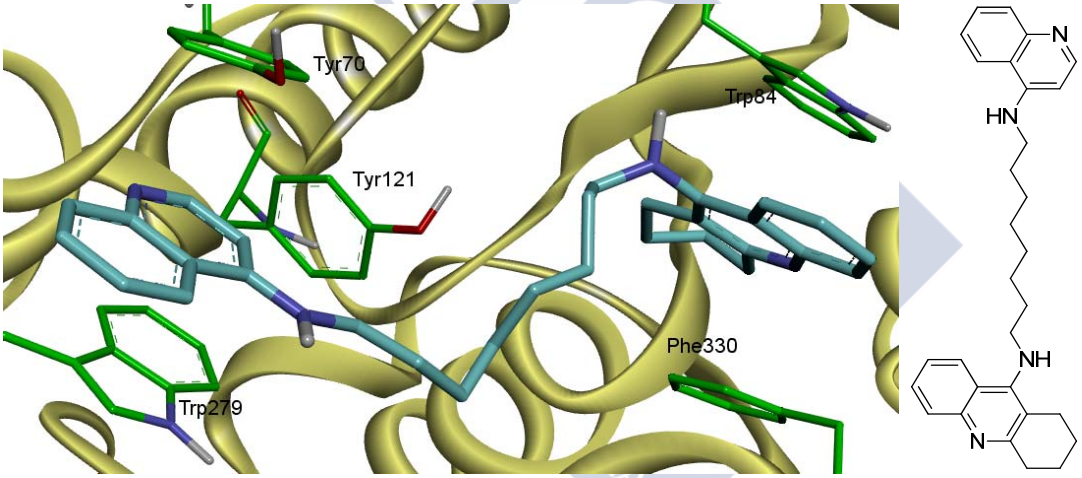


Figura 5.2.- Detalle de las interacciones del derivado de la bis-tacrina indicado en su complejo con AChE. (PDb id. 1ODC).

Por otra parte, simulaciones de dinámica molecular de monómeros u oligómeros del péptido amiloide unido a ligandos con grupos aromáticos indican que una de las regiones de unión más frecuentes son los residuos de fenilalanina localizados en posiciones 19-20.[38,139] La Figura 5.3 ilustra un ejemplo de este tipo de interacciones, donde se puede ver cómo uno de los ligandos estudiados (el 1,4-naftoquinon-2-il-L-triptófano) interactúa con el fenilo de la cadena lateral de Phe19, uno de los residuos del péptido Aβ-42.

Por lo tanto, un posible farmacóforo multidiana para las dianas estudiadas de la cascada amiloide contendría un grupo hidroxiamina para su interacción con la díada aspártica catalítica de BACE-1 y grupos aromáticos en uno o ambos extremos (indicados como R_1 y R_2 en el Esquema 5.1) para fomentar la interacción con AChE y el péptido Aβ.

139. R. Scherzer-Attali, R. Pellarin, M. Convertino, A. Frydman-Marom, Nirit Egoz-Matia, S. Peled, M. Levy-Sakin, D.E. Shalev, A. Caflisch, E. Gazit, D. Segal. *PLOS One*. **2010**, *5*, e11101

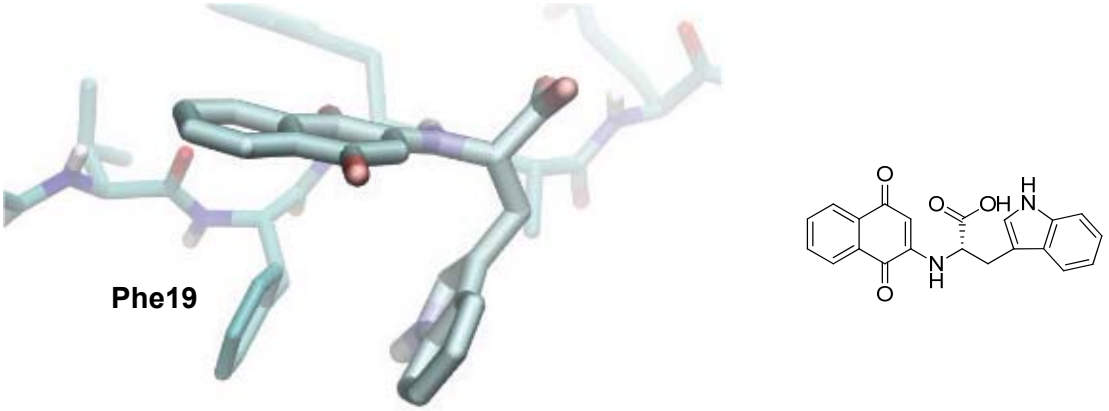


Figura 5.3.- Modelización del apilamiento π (*face-to-face* y *face-to-edge*) del residuo Phe19 del péptido Aβ-42 y el 1,4-naftoquinon-2-il-L-triptófano (Imagen extraída de ref.139).

5.2.- METODOLOGÍA.

5.2.1.- Selección de candidatos.

Hemos llevado a cabo la búsqueda de candidatos viables para la inhibición de las tres dianas escogidas, que cumplan con las premisas del farmacóforo estipuladas en el apartado anterior (Esquema 5.1), a través de una extensiva búsqueda en las bases de datos de ZINC[140] y SciFinder,[141] así como la bibliografía. Para afinar la búsqueda entre los resultados de SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System)[142] obtenidos mediante ZINC, empleamos una rutina escrita en el lenguaje de programación AWK, capaz de identificar el fragmento hidroxiamina del farmacóforo entre los candidatos de la base de datos ZINC (ver anexo 5.8 al final del capítulo). Otro factor a considerar en compuestos cabeza de serie para el tratamiento de la EA es la capacidad de los candidatos de atravesar la barrera hematoencefálica (como habíamos discutido en el apartado 1.5.1 del capítulo 1); por ello, además de presentar un grupo hidroxiamina, los candidatos seleccionados de estas bases de datos también deberían presentar, entre otras características, un peso molecular inferior a 500 UMA (condición que se cumple para los compuestos estudiados, a excepción de los derivados de carbazol bromados y derivados de indol dibromados) y un único grupo funcional cargado (la amina en el grupo hidroxiamina).

5.2.2.- Simulación de acoplamiento proteína ligando. Docking.

Hemos llevado a cabo los cálculos de acoplamiento con la suite de módulos residentes en GOLD[128] (Genetic Optimisation for Ligand Docking), descrita en el capitulo anterior. Para cada simulación de acoplamiento empleamos un mínimo de 100.000 generaciones y un máximo de 1.250.000, independientemente de la proteína estudiada. Permitimos la inversión de los centros de amina sp^3 (conocido como efecto "paraguas", que permite el tránsito del par libre de la amina para la inversión de la disposición tetraédrica de ésta) y la rotación libre de los enlaces sencillos de los candidatos a inhibidor durante el proceso de acoplamiento. Salvo que se indique lo contrario, asignamos a los grupos amino del inhibidor un estado protonado. Para

140. J.J. Irwin, B.K. Shoichet. *J. Chem Inf. Model.* **2005**, *45(1)*, 177-182
141. SciFinder © 2013 American Chemical Society.
142. a) D. Weininger. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31-36 b) D. Weininger, A. Weininger, J.L. Weininger. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, *29*, 97-101 c) D. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1990**, *30*, 237-243

elaborar un ranking de las poses de los ligandos en los cálculos de acoplamiento se emplearon tres técnicas de evaluación residentes de GOLD: *ChemScore*,[129,130] *GoldScore*[131,132] y *ChemPLP*,[133] descritas en el capítulo 4. Las cadenas laterales de los residuos localizados en el sitio activo de las enzimas empleadas permanecen fijas. Además, el acoplamiento a cada tipo de proteína (BACE-1 y AChE) presenta variantes en ciertos aspectos de la metodología, que pasamos a explicar en detalle a continuación.

5.2.2.1.- Acoplamiento en BACE-1.

Como hemos explicado en el capítulo 1, el escrutinio de las estructuras BACE-1-inhibidor depositadas en el PDB indican que la horquilla β (o *flap*), formada por los residuos 69 a 75 y encargada de cubrir el sitio activo de BACE-1, presenta cierta plasticidad conformacional que depende de la naturaleza del inhibidor unido a la enzima. Este *flap* se encuentra en una posición próxima a la díada aspártica de la enzima cuando ésta se encuentra cerrada durante el proceso catalítico. Existen inhibidores diseñados para evitar que el *flap* adopte esta posición, entorpeciendo así la actividad catalítica. Para tener en cuenta la plasticidad del sitio activo derivada de la flexibilidad del *flap* hemos llevado a cabo las simulaciones de acoplamiento en BACE-1 con tres estructuras distintas, cada una de las cuales presenta un nivel diferente de proximidad entre el *flap* y la díada catalítica. La primera de estas estructuras, con código en el PDB 1FKN,[25] presenta un complejo enzima-inhibidor peptidomimético con el *flap* cerrado; la segunda estructura, con código de PDB 3KMY,[125] presenta un complejo enzima-inhibidor no peptídico con el *flap* en una posición de apertura media; por último, la estructura con código de PDB 1W50[143] corresponde a la forma *apo* de la proteína (esto es, la estructura de la proteína libre) con el *flap* completamente abierta. La Figura 5.4 muestra una superimposición de estas estructuras con el *flap* en tres colores diferentes de acuerdo a su apertura.

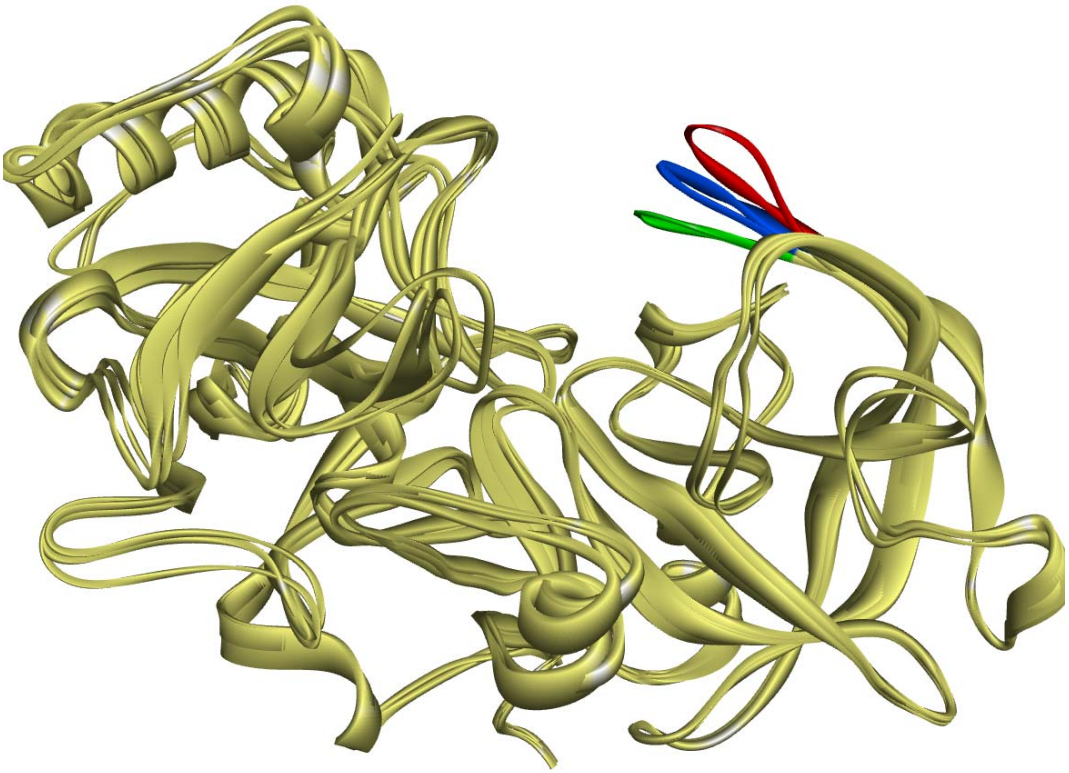


Figura 5.4.- Superimposición de las estructuras cristalográficas de BACE-1 con los códigos PDB 1FKN (*flap* en verde), 3KMY (*flap* en azul) y 1W50 (*flap* en rojo).

143. S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, J. Yon. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 407-416

Como primer paso de nuestros cálculos, añadimos los átomos de hidrógeno, excluimos las moléculas de agua y eliminamos las conformaciones alternativas de las estructuras mencionadas (1FKN, 3KMY y 1W50), mediante el empleo de los módulos pertinentes de la suite de programas Discovery Studio.[95] Determinamos el sitio de enlace de los ligandos en BACE-1 en el protocolo de GOLD[128] usando como referencia específica el inhibidor presente en la estructura de código PDB 3KMY. Definimos la región de enlace como todos los átomos de la proteína accesibles por el disolvente en un radio de 6 Å alrededor de dicho inhibidor.

La asignación inicial del estado de protonación de la díada aspártica se basa en nuestras predicciones para BACE-1 cuando está unida a un ligando con isostero hidroxietilamina (ver capitulo 3). Los resultados de esos estudios indicaban que la díada estará monoprotonada, con el protón localizado en el oxígeno interno de Asp32. Para cada combinación de inhibidor, apertura del *flap*, y función de evaluación, calculamos un total de 25 poses, que difieren en la orientación de los inhibidores en el sitio activo de la enzima y en la conformación que estos inhibidores adoptan.

Se define como un "*hit*" de acoplamiento para BACE-1 una pose de salida en la que se puede observar contacto doble entre la díada catalítica y la unidad hidroxiamina, de acuerdo al esquema de nuestro farmacóforo. Específicamente, se busca una conformación del ligando en que uno de los carboxilos de la díada catalítica establece un enlace de hidrógeno con el hidroxilo del ligando, y el otro carboxilo de la díada catalítica establece un enlace de hidrógeno o electrostático con la amina protonada. Generalmente los *hits* se buscan entre las tres poses de resultado más alto de evaluación para los compuestos de menor tamaño y mayor rigidez, lo que supone un menor número de grados de libertad (las cumarinas, apartado 5.3), y entre las diez primeras poses para aquellos compuestos que presentan un mayor tamaño y mayor flexibilidad (carbazoles e indoles, apartados 5.4 y 5.5), lo que supone un mayor número de grados de libertad, para cada una de las nueve posibles combinaciones de función de evaluación y apertura del *flap*. Las estadísticas de éxito se determinan teniendo en cuenta si hay al menos una pose con la definición de *hit* dada en el intervalo especificado. Los resultados globales de *hit* presentados en las gráficas se calculan mediante la adición del número de combinaciones de apertura de *flap* y función de evaluación para las que se observa al menos un *hit*.

5.2.2.2- Acoplamiento en AChE.

Para las simulaciones de acoplamiento en Acetilcolinesterasa, empleamos como estructura de partida el complejo de la proteína obtenida de *Torpedo californica* con un derivado de tacrina depositado en el Protein DataBank con el código 1ODC.[43] En dicho complejo puede observarse el apilamiento π de los grupos aromáticos en los extremos del ligando con Tyr 70 y Trp 279 en el sitio aniónico periférico y con Trp 84 y Phe330 en el sitio catalítico (ver Figura 5.2). Hemos descrito en detalle estas regiones de la enzima en el capítulo 1. Como se ha indicado en dicho capítulo, la numeración de los aminoácidos en la cadena corresponde a la de la enzima extraída del *Torpedo californica*.

Como se hizo anteriormente con BACE-1, empleamos Discovery Studio para limpiar la estructura de la proteína de conformaciones alternativas, retirar las moléculas de agua, y añadir los átomos de hidrógeno.

Hemos definido el sitio activo como la región de AChE que contiene los residuos accesibles al agua que se encuentran a 6 Å alrededor del ligando derivado de la *bis*-tacrina presente en la estructura 1ODC (ver Figura 5.2).[43] Dado que en AChE existen dos sitios con los que pueden interactuar los candidatos a inhibidor, para aquellos compuestos capaces de alcanzar ambos

simultáneamente, decidimos ampliar ligeramente el total de poses generadas, de 25 a 30, para disponer de un mayor rango de orientaciones y poder observar si varían los grupos específicos que interaccionan con cada uno de los sitios. Como en el caso de BACE-1, se emplearon las tres funciones de evaluación para generar las poses. En cada cálculo se tomaron las tres mejores poses para determinar *hit* cuando los candidatos son de tamaño reducido y estructuralmente rígidos, lo que reduce sus grados de libertad (las cumarinas, apartado 5.3), y las 10 mejores poses cuando los candidatos presentan mayor tamaño y flexibilidad, y por tanto un número más elevado de grados de libertad (carbazoles e indoles, apartados 5.4 y 5.5). Las estadísticas de éxito se basan en la búsqueda de una pose con la definición de *hit* dada en el intervalo especificado.

En el caso de AChE, hemos definido como *hit* aquellas poses en que se produce un apilamiento π (o π-stacking) de tipo "cara a cara" (face-to-face) de los grupos aromáticos del inhibidor con las cadenas laterales de los sitios catalítico y periférico con el ligando, como se muestra en la Fig. 5.2. La disposición de los residuos Tyr70 y Trp279 en el sitio periférico y de los residuos Trp84 y Phe330 en el sitio catalítico es tal que pueden establecer una interacción de apilamiento π de tipo "cara a cara" con una unidad aromática plana del inhibidor en cualquiera de estos sitios de enlace. Este tipo de interacción "cara a cara" se distingue por la disposición paralela entre dos unidades aromáticas a una distancia de interacción π adecuada, como muestra la Figura 5.2. En el caso de que el candidato carezca del tamaño suficiente para alcanzar ambos sitios de apilamiento π a la vez, se buscará que establezca este tipo de interacción con uno de los dos sitios, en lugar de ambos simultáneamente. Los resultados globales de *hit* presentados en las gráficas correspondientes se calculan mediante la adición del número de resultados de función de evaluación para las que se observa al menos un *hit*.

5.2.3.- Estudios de Inhibición de Agregación.

Como hemos explicado en la introducción de esta tesis, uno de los posibles objetivos terapéuticos a nivel molecular es la inhibición de la agregación de los fragmentos peptídicos Aβ-42 que conduce a la formación de oligómeros, especies altamente tóxicas a nivel neuronal. Estos agregados peptídicos no presentan un único sitio de enlace con los ligandos, al contrario que las otras dianas de la cascada amiloide. En lugar de ello, este tipo de diana presenta múltiples sitios de enlace que dependen de la naturaleza del ligando. Así por ejemplo, aquellos inhibidores que presentan sustituyentes aromáticos son afines a las regiones del péptido ricas en residuos aromáticos. Existen simulaciones de inhibición de la agregación amiloide que combinan cálculos de acoplamiento con simulaciones de dinámica molecular.[38] En nuestro caso, hemos explorado una aproximación desarrollada en el grupo del profesor Caflisch,[35] basada en en análisis de simulaciones largas de DM de un segmento del péptido β-amiloide en presencia de un candidato a ligando.

Siguiendo el protocolo de Caflish, preparamos una cadena peptídica compuesta por los residuos que ocupan las posiciones 12 a 28 de la cadena del péptido Aβ-42.[35] Se emplea este tramo en lugar de la secuencia completa de residuos por dos motivos: En primer lugar, los residuos 12-28 contienen el llamado clúster central hidrofóbico (residuos 17 a 21, secuencia LVFFA), los cuales desempeñan un papel crítico en mediar interacciones péptido-inhibidor así como péptido-péptido. Por otra parte, los residuos 1-11 carecen de cualquier tipo de estructura en los oligómeros de los péptidos Aβ[35] y por lo tanto se espera que su supresión no afecte a los resultados y que la correspondiente reducción de tamaño del péptido aumente la probablidad de una convergencia más rápida de los resultados de las trayectorias de dinámica molecular.

Llevamos a cabo las simulaciones de dinámica molecular (DM) con el programa CHARMM, empleando como campo de fuerzas para el cálculo PARAM-19,[97] que únicamente incluye átomos pesados e hidrógenos unidos a átomos polares (como Nitrógeno y Oxígeno). Para simular el efecto del disolvente de manera implícita, empleamos la aproximación basada en la ecuación de Born generalizada conocida como FACTS (Fast Analytical Continuum Treatment of Solvent) desarrollada en grupo de investigación de Amedeo Caflisch.[144] El protocolo de cálculo empleado incluye los siguientes pasos: en primer lugar, dos etapas de minimización de energía: la primera con 500 pasos de Steepest Descent y la segunda contiene 50000 pasos con el protocolo Conjugate Gradient. En estos cálculos, el gradiente de tolerancia fue de 0.001 kcal/(mol·Å^2). A continuación se llevan a cabo los cálculos de DM que contienen tres etapas: una primera etapa de calentamiento, donde se elevó la temperatura de 100 a 300K en una trayectoria de 5 ns, a la cual siguió una etapa de equilibración de 10 ns. La etapa de producción se llevó a cabo a 300K con un tiempo de integración de 2 fs durante 1 μs. Para incrementar el muestreo conformacional, se realizaron en cada caso múltiples simulaciones paralelas de este tipo. En el caso de las cumarinas, se emplearon tres simulaciones paralelas, para el resto de ejemplos, cinco, partiendo de coordenadas iniciales diferentes. Todo este proceso se lleva a cabo definiendo las condiciones de límites periódicos (Periodic Boundary Conditions) con una concentración fija de péptido de 2.5 mM (una celda cúbica de 87 Å de lado), empleando un integrador de Langevin a baja fricción (coeficiente de 0.15 ps^{-1}).

Las coordenadas de cada fotograma de las trayectorias (usadas en el análisis de los cálculos) se grabaron cada 50 ps, y las hemos empleado para el análisis de los tiempos de contacto ligando-péptido y péptido-péptido. En el primero de estos cálculos se evalúa la fracción del total de la trayectoria en la que al menos un átomo pesado del ligando se encuentra a menos de 7.5 Å de distancia de al menos un átomo pesado de cualquier residuo del péptido. Para evaluar los contactos específicos de ligando con cada uno de los residuos del péptido, hemos llevado a cabo cálculos con un límite de 4.5 Å de distancia entre átomos pesados de ambas moléculas. Para calcular el efecto del ligando sobre la estructura del péptido hemos evaluado el contacto residuo-residuo, expresado como la fracción total de la trayectoria empleando un límite 4.5 Å de distancia entre átomos pesados de residuo.

5.2.4.- Síntesis de candidatos.

La síntesis de los compuestos se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del profesor J. Sardina en los laboratorios del CIQUS de la Universidad de Santiago de Compostela, siguiendo las rutas sintéticas que se indican para cada caso en la correspondiente sección de resultados.

5.2.5.- Evaluación Experimental.

Ensayos experimentales de la inhibición de BACE-1. Estos ensayos se llevaron a cabo en la plataforma de screening de fármacos USEF, en los laboratorios del CIMUS de la Universidad de Santiago de Compostela. Los compuestos se evaluaron mediante un método homogéneo basado en medidas de fluorescencia de tipo FRET. El kit de evaluación emplea un anticuerpo-anti-biotina marcado con terbium (Tb) y sustrato de BACE-1 marcado con biotina y fluoresceína. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del kit comercial.

Ensayos experimentales de la inhibición de AChE y BuChE. Estos ensayos se llevaron a cabo en el grupo de investigación del profesor A. Carotti de la Universidad de Bari. Los ensayos de

144. U. Haberthür, A. Caflisch. *J. Comp. Chem.* **2007**, *29,* 701-715

inhibición se llevaron a cabo según el método espectrofotométrico de Ellman,[145] empleando AChE de anguila eléctrica y BuChE de suero equino. Las curvas de concentración/inhibición se determinaron por regresión no lineal. Todos los compuestos se probaron en un rango de concentraciones necesarias para una inhibición que oscila desde el 20% hasta el 80%.

Ensayos experimentales de la inhibición de agregación de Aβ-42. Como en el caso de AChE, estos ensayos se llevaron a cabo en el grupo de investigación del profesor A. Carotti de la Universidad de Bari. Los ensayos se llevaron a cabo mediante espectroscopia de fluorescencia de la Tioflavina T (ThT),[146] que emplea la variación en la emisión fluorescente del ThT al acoplarse y desacoplarse con las fibrillas como medida indirecta de la agregación de la lámina-β que lleva a la formación de fibrillas.

5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. CUMARINAS.

En el primer cribado de bases de datos para la búsqueda de candidatos con el farmacóforo hidroxiamina descrito en el Esquema 5.1, encontramos más de 300 posibles candidatos. Para reducir el número de candidatos, llevamos a cabo una fase de *screening* previo, consistente en una simulación de acoplamiento en BACE-1 evaluada mediante la función *GoldScore* de baja resolución. El objetivo era llevar a cabo un cribado previo de los candidatos empleando un número reducido de generaciones, para determinar *hits* preliminares y así reducir el número de compuestos a estudiar en detalle a cantidades más manejables. Durante esta primera criba observamos una cantidad significativa de estructuras de 8-aminometil-7-hidroxi-4-metilcumarinas, por lo que realizamos un estudio más extenso del acoplamiento de estos compuestos mediante el empleo de tres funciones de evaluación.

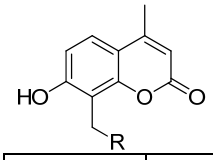
5.3.1.- Estudios de acoplamiento en BACE-1.

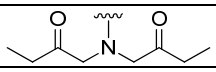
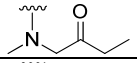
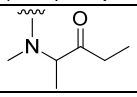
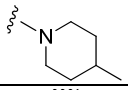
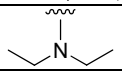
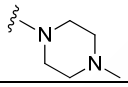
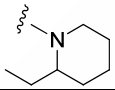
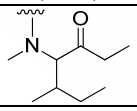
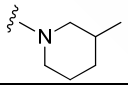
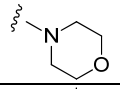
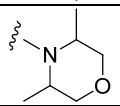
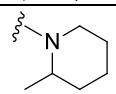
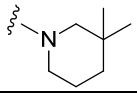
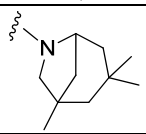
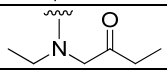
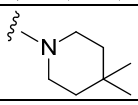
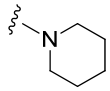
Los valores de las funciones de evaluación para las poses de enlace a BACE-1 de las cumarinas seleccionadas se listan en la Tabla 5.1. Se puede observar que algunos compuestos presentan *hit* para al menos una de las tres funciones de evaluación empleadas. Específicamente, los *hits* se observan cuando el *flap* está en la conformación abierta generando las poses con la función de *ChemScore* o cuando el *flap* está en la conformación semi-abierta y la búsqueda de poses se realiza con la función de *GoldScore*. No se observan *hits* para ninguna otra combinación de técnica de evaluación y apertura de *flap* aparte de las indicadas anteriormente, indicando que los niveles de consenso para muchas de estas moléculas son bajos. Sólo tres compuestos (**2**, **5** y **15**) muestran un *hit* con más de una combinación de posición de *flap* y función de evaluación.

La Figura 5.5 muestra las poses de *hit* de dos candidatos cuando éstos están unidos al sitio activo de BACE-1. Como se puede observar en esta figura el grupo amina protonado forma un par iónico con el residuo Asp 228, mientras que el grupo hidroxilo forma enlace de hidrógeno con Asp32 (el residuo neutro de la díada).

145. G.L. Ellman, D. Courtney, V. Jr. Andres, R.M. Featherstone. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95
146. M. Necula, R.Jayed, S. Milton. C.C. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10311-10324

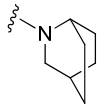
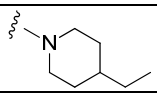
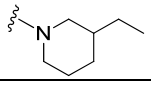
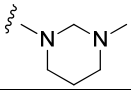
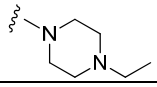
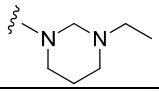
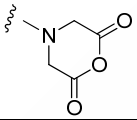
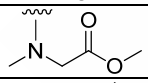
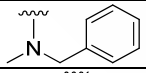
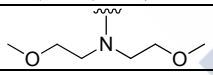
Tabla 5.1.- Resultados de acoplamiento en BACE-1 de cumarinas.



Candidato	R	Función de evaluación[a]								
		ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
		Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo
1		--	--	--	--	--	--	--	--	--
2		21.95 (03)	--	--	--	48.53 (01)	--	--	--	--
3		22.81 (01)	--	--	--	--	--	--	--	--
4		--	--	--	--	49.01 (01)	--	--	--	--
5		21.69 (03)	--	--	--	46.19 (02)	--	--	--	--
6		22.39 (02)	--	--	--	--	--	--	--	--
7		--	--	--	--	--	--	--	--	--
8		--	--	--	--	--	--	--	--	--
9		--	--	--	--	48.97 (01)	--	--	--	--
10		22.99 (03)	--	--	--	--	--	--	--	--
11		--	--	--	--	--	--	--	--	--
12		--	--	--	--	--	--	--	--	--
13		--	--	--	--	51.15 (01)	--	--	--	--
14		--	--	--	--	--	--	--	--	--
15		21.41 (01)	--	--	--	52.31 (01)	--	--	--	--
16		--	--	--	--	--	--	--	--	--
17		--	--	--	--	48.48 (01)	--	--	--	--

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5.1 (Cont).

Candidato	R	Función de evaluación[a]								
		ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
		Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo
18		--	--	--	--	--	--	--	--	--
19		--	--	--	--	--	--	--	--	--
20		--	--	--	--	--	--	--	--	--
21		--	--	--	--	49.96 (01)	--	--	--	--
22		--	--	--	--	--	--	--	--	--
23		--	--	--	--	47.03 (01)	--	--	--	--
24		--	--	--	--	--	--	--	--	--
25		--	--	--	--	48.96 (02)	--	--	--	--
26		--	--	--	--	--	--	--	--	--
27		--	--	--	--	--	--	--	--	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit*. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (Abto), apertura media (Med), y cerrado (Crdo).

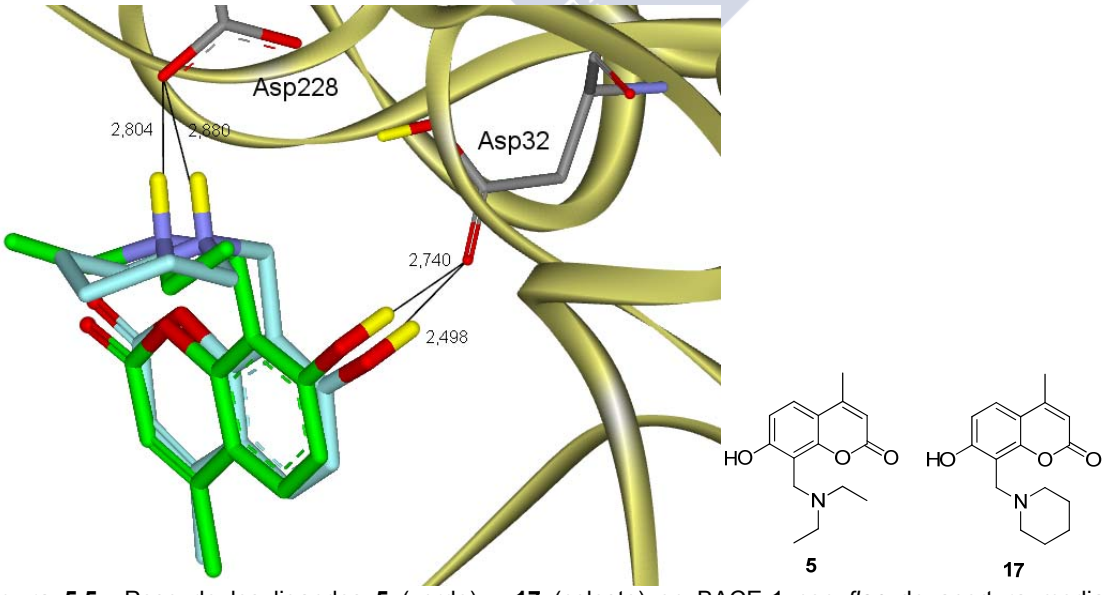


Figura 5.5.- Pose de los ligandos **5** (verde) y **17** (celeste) en BACE-1 con *flap* de apertura media, obtenidas con la función de evaluación *GoldScore*.

5.3.2.- Estudios de Acoplamiento en AcetilColinesterasa.

Existen una gran cantidad de estudios que indican que diversas cumarinas con patrones de sustitución variados presentan afinidad por AChE.[19] Las 7-hidroxicumarinas con sustituyentes en la posición 8 presentan un nuevo tipo de sustitución que no ha sido estudiada anteriormente como inhibidores de AChE. Como hemos explicado en la introducción de esta tesis, los inhibidores de AChE pueden servir como parte de la terapia colinérgica, que ya ha sido empleada clínicamente como paliativo en casos de enfermedad de Alzheimer leve y media.[147] Además, este tipo de compuestos pueden actuar como inhibidores de la formación de fibras amiloides cuando se unen al PAS de esta enzima. Por todo ello, hemos evaluado la afinidad de nuestras cumarinas empleado la función de evaluación *ChemPLP*,[133] una función muy eficiente en estudios de *docking*.[148]

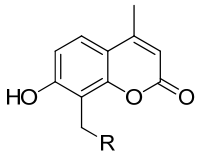
El tamaño de las cumarinas candidatas a inhibidor impide que éstas interaccionen con los sitios aniónicos catalítico y periférico de AChE a la vez (ver sección de metodología). El criterio de *hit* para las cumarinas busca únicamente el apilamiento π en uno de los dos posibles sitios de unión. Por esta razón se realizaron dos cálculos de acoplamiento independientes en AChE, uno centrado en el sitio aniónico catalítico (CAS) y el otro en el sitio aniónico periférico (PAS). Los resultados de estos cálculos se pueden ver en la Tabla 5.2.

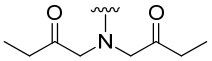
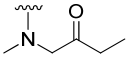
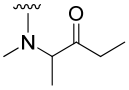
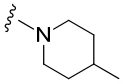
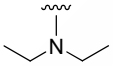
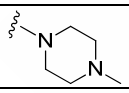
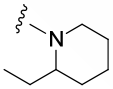
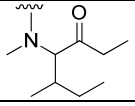
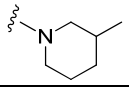
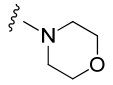
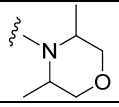
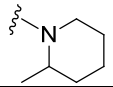
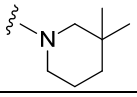
En la Figura 5.6 (Página 109) se ilustra uno de los candidatos a inhibidor y sus interacciones con ambos sitios, predichas por los cálculos de acoplamiento. En dicha figura puede observarse la disposición de apilamiento π con Phe330 (en CAS) y Tyr70 (en PAS). La figura también muestra el residuo Tyr121, un residuo localizado en el canal que comunica ambos sitios. El escrutinio de la Figura 5.5 indica que existe una pequeña distorsión en la disposición paralela del segmento anular del inhibidor con los residuos Trp84 y Trp279, localizados en el CAS y en el PAS de AChE respectivamente. Esto podría ser el resultado de haber llevado a cabo los cálculos de acoplamiento con las cadenas laterales de los residuos del sitio activo fijos. Una manera de mejorar los resultados incluiría flexibilidad en los cuatro residuos aromáticos claves de AChE durante las simulaciones de acoplamiento, para mejorar las interacciones de apilamiento π.

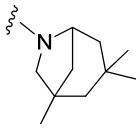
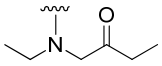
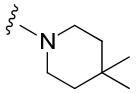
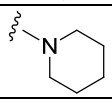
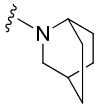
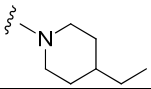
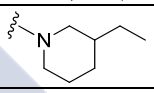
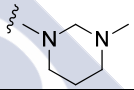
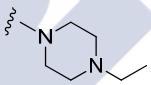
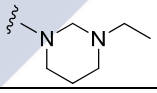
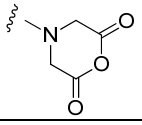
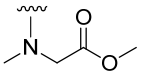
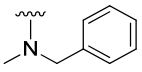
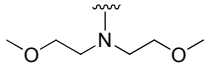
Como se aprecia en la tabla 5.2, existe un número significativo de compuestos que no presentan diferencias pronunciadas entre los valores de evaluación para el sitio aniónico catalítico y el sitio aniónico periférico, lo que indica que estos ligandos podrían tener preferencias similares por ambos sitios de enlace. De esto podemos deducir que existen probabilidades de encontrar a las cumarinas tanto en el sitio aniónico periférico (PAS), donde podrían prevenir que el PAS de AChE ayude a promover la agregación Aβ, como en el sitio aniónico catalítico (CAS), donde tendría un efecto colinérgico positivo. Sin embargo, existen estudios[149] que indican cierta preferencia de las cumarinas por un enlace en el PAS, que describiremos en más detalle durante la discusión de los resultados experimentales.

147. M.N. Sabbagh, M.R. Farlow, N. Relkin, T.G. Beach. *Alzheimer's & Dementia* **2006**, *2*, 118-125
148. Ver trabajo titulado "GOLD scoring function performance against the DUD decoy/active set " disponible en la sección de recursos de la web del Cambridge Crystallographic Data Centre, http://www.ccdc.cam.ac.uk/
149. V. Simeon-Rudolf, Z. Kovarik, Z. Radić, E. Reiner. *Chem. Biol. Inter.* **1999,** *119-120***,** 119-128

Tabla 5.2.- Resultados de acoplamiento en AChE de cumarinas.



Candidato	R	*ChemPLP*[a]	
		PAS	CAS
1		87.53 (01)	100.57 (01)
2		74.40 (01)	83.94 (01)
3		75.04 (01)	84.74 (01)
4		72.45 (01)	82.13 (01)
5		76.01 (01)	77.70 (01)
6		67.51 (01)	68.08 (01)
7		70.95 (01)	83.22 (01)
8		79.40 (01)	86.35 (01)
9		73.52 (01)	85.15 (01)
10		69.83 (01)	74.16 (01)
11		72.06 (01)	77.92 (01)
12		69.71 (01)	82.57 (01)
13		75.76 (01)	76.59 (01)

Candidato	R	*ChemPLP*[a]	
		PAS	CAS
14		76.82 (01)	76.10 (01)
15		77.43 (01)	86.86 (01)
16		72.49 (01)	70.91 (01)
17		68.07 (01)	80.76 (01)
18		71.89 (01)	70.02 (01)
19		74.39 (01)	73.01 (01)
20		76.99 (01)	84.77 (01)
21		70.40 (01)	80.23 (01)
22		72.90 (01)	71.38 (01)
23		74.53 (01)	86.54 (01)
24		66.79 (01)	79.46 (01)
25		75.09 (01)	81.65 (01)
26		83.42 (01)	82.60 (01)
27		78.53 (01)	88.97 (01)

[a]Sólo se indican los valores de la salida de la función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit*.

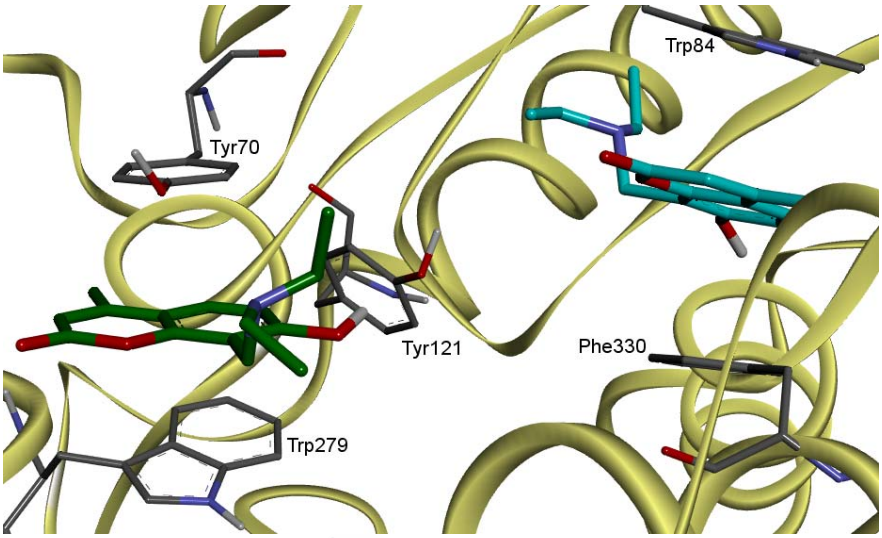


Figura 5.6.- Modo de acoplamiento de la primera pose en el ranking del compuesto **5** cuando está unido al sitio aniónico catalítico (azul) y en el sitio aniónico periférico (verde), obtenido por nuestras simulaciones de acoplamiento.

5.3.3.- Estudios de inhibición de agregación a nivel monomérico

Como hemos explicado en el capítulo de introducción de esta tesis, uno de los posibles objetivos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es la prevención de la formación de agregados de péptidos Aβ-42. Se ha observado que numerosos ligandos con grupos aromáticos tienen la capacidad de interferir en la agregación amiloide,[35] por lo que las cumarinas estudiadas podrían ser buenos candidatos a inhibidores de la nucleación de la oligomerización de Aβ. 5

Hemos llevado a cabo estudios de simulación de mecánica molecular con un conjunto de 7 derivados de cumarina. Los resultados de esta simulación se recogen en la Tabla 5.3, así como en las Figuras 5.6 y 5.7.

La Tabla 5.3 recoge la fracción de tiempo de contacto de los candidatos a inhibidor indicados con el fragmento del péptido estudiado (ver metodología). En ella se puede observar que las cumarinas presentan un tiempo de residencia similar al del compuesto de referencia, la 9,10-antraquinona, un ligando capaz de inhibir la formación de fibrillas (30% a 100 µM). Únicamente el compuesto **17** muestra una fracción de tiempo de contacto marcadamente superior.

Las Figuras 5.7 y 5.8 recogen los resultados de contacto inhibidor-residuo y contacto residuo-residuo, respectivamente. El tiempo de contacto de estos ligandos con cada uno de los residuos de la cadena peptídica es similar al que hemos obtenido de los cálculos realizados para el ligando de referencia (9,10-antraquinona), con la excepción de **17**, que muestra un tiempo de residencia más elevado.

Tabla 5.3.- Valores de fracción de tiempo de contacto de las cumarinas y la referencia con el péptido Aβ12-28.

Candidato	Tiempo de contacto
5	0.33
6	0.33
10	0.29
17	0.50
25	0.23
26	0.36
27	0.33
Antraquinona	0.36

Como se aprecia en la Figura 5.7, todos los compuestos tienen la fracción de tiempos de residencia más altos en el segmento peptídico hidrofobico que contiene los residuos Phe19 y Phe20. La única excepción la presenta la cumarina **17,** donde el máximo absoluto se encuentra en la región de los residuos His13 y His14 en lugar de la región LVFFA.

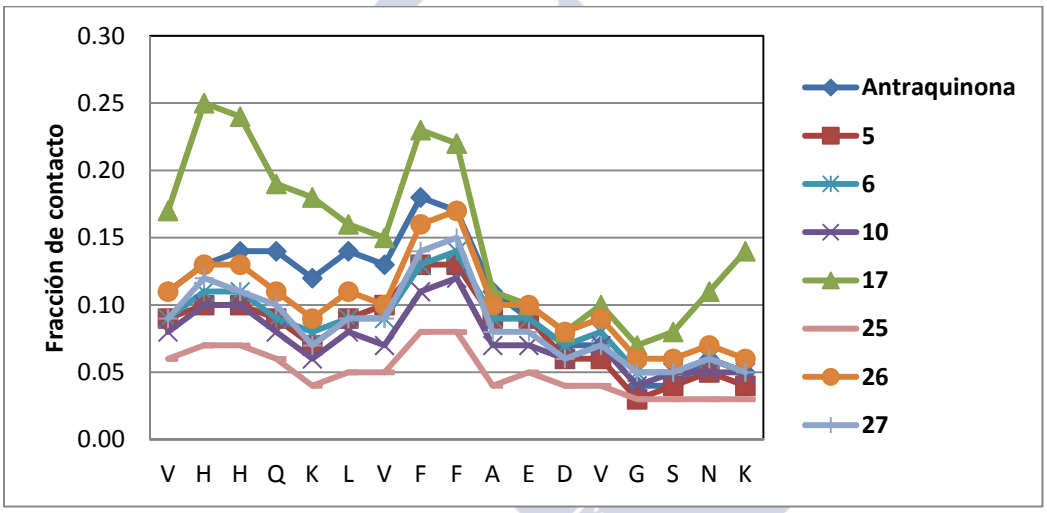


Figura 5.7.- Valores de fracción de tiempo de contacto residuo peptídico-candidato inhibidor.

Finalmente, como se puede observar en el mapa de contactos de los residuos del péptido en función del tiempo (Figura 5.8), nuestros cálculos estiman que únicamente **5** presenta cierta capacidad de evitar la formación de horquillas-β. Se esperaría que aquellos compuestos que permanecen más tiempo en la proximidad de los residuos del péptido tuviesen un mayor efecto inhibitorio sobre la formación de horquillas-β. Analisis de la Tabla 5.3 y las Figuras 5.7 y 5.8 indican que este no es el caso. Por ejemplo, el compuesto **17** posee tiempos de residencia más altos en la proximidad del péptido que los obtenidos para los compuestos **5** y 9-10 antraquinona. Como se puede ver en la Figura 5.8 esto no se traduce en una inhibición mayor de la formación de los contactos entre los residuos HQK (14-15-16) y VGS (24-25-26), contactos necesarios para la formación del bucle que creemos origina la oligomerización.

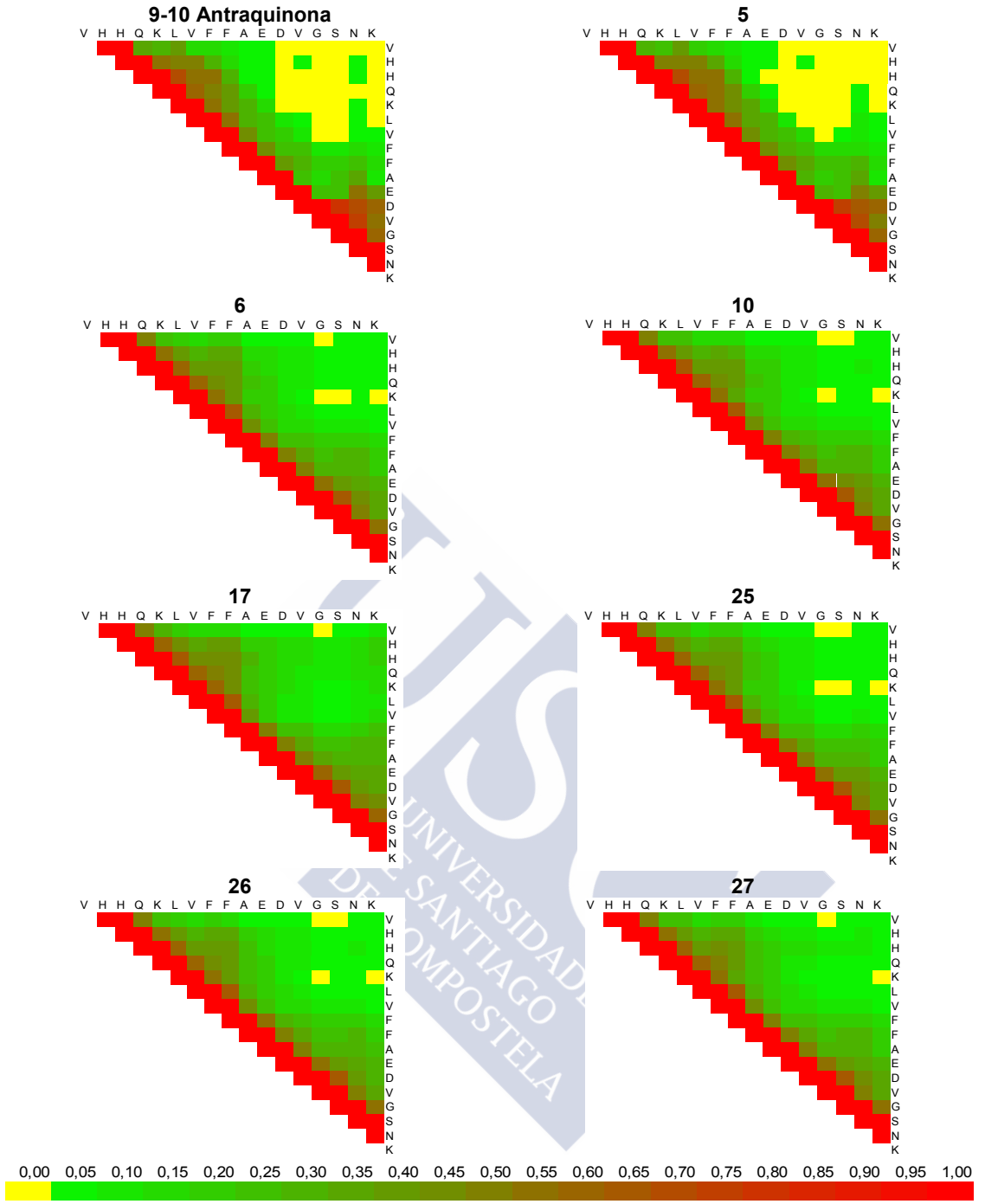


Figura 5.8.- Mapas de tiempos de contacto (dado por la escala de colores) intra-péptidico en presencia de los diferentes inhibidores. No se muestra la diagonal.

La Figura 5.9 muestra una pose de contacto entre las cumarinas y la cadena peptídica extraída de nuestras trayectorias de simulación de DM, donde se puede observar el apilamiento π entre el anillo aromático del inhibidor **5** y el residuo Phe19 de la cadena peptídica.

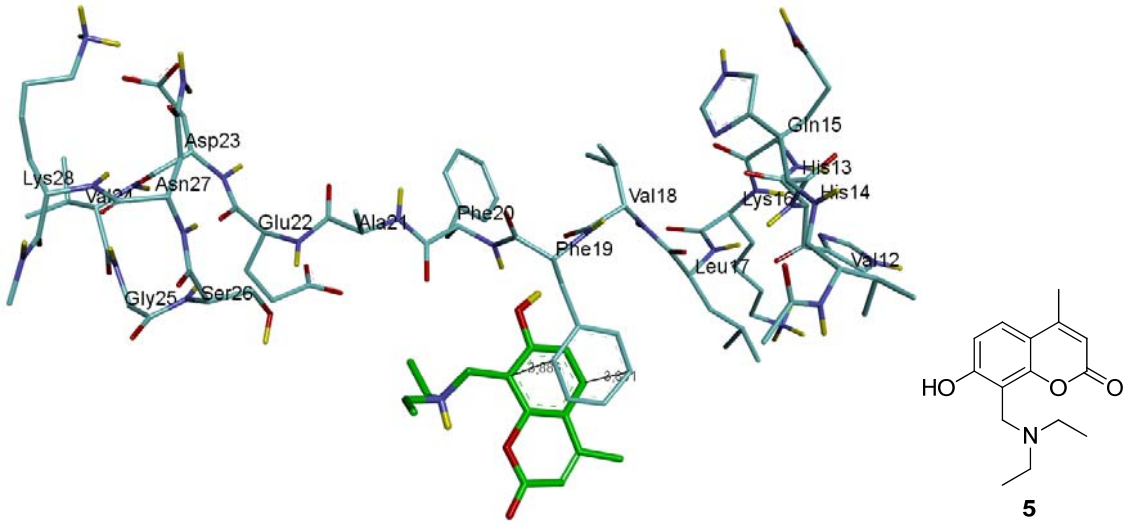
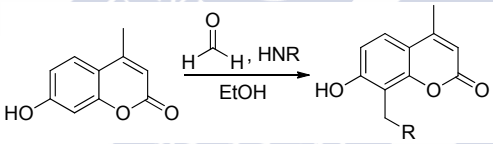


Figura 5.9.- Imagen extraída de una trayectoria de simulación de dinámica molecular del fragmento 12-28 de la cadena Aβ-42 (celeste) en un entorno con el fragmento **5** (verde).

5.3.4.- Sintesis de cumarinas.

Nuestros colaboradores sintéticos llevaron a cabo la síntesis de los compuestos **5**, **6**, **10**, **17**, **25**, **26** y **27**. El proceso general de la síntesis se resume en el Esquema 5.2. Como muestra dicho esquema, la síntesis se lleva a cabo mediante la reacción de Mannich,[150] específicamente mediante la adición a 3-metil 7-hidroxicumarina de una mezcla de formaldehido al 40% con una amina secundaria adecuada en un medio de etanol al 95%.



Esquema 5.2.- Esquema general de la reacción de Mannich para la síntesis de derivados de cumarina. Los compuestos sintetizados se indican en la Tabla 5.4.

5.3.5.- Resultados de la evaluación experimental.

Los resultados experimentales se recogen en la Tabla 5.4, que muestra los resultados de afinidad para las dianas de la cascada amiloide, BACE-1 y AChE, así como los resultados del ensayo ThT de inhibición de agregación de fibrillas. También se presentan los resultados de afinidad de los ligandos con butirilcolinesterasa (BuChE).

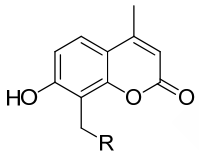
Como se puede observar en la Tabla 5.4, estos compuestos presentan la afinidad más alta hacia AChE, a nivel micromolar. La afinidad de las cumarinas hacia otras dianas como BACE-1 y agregación es sustancialmente menor, alcanzado únicamente niveles de inhibición milimolar.

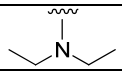
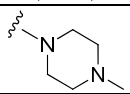
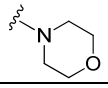
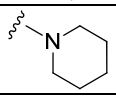
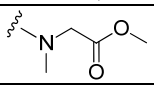
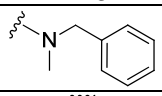
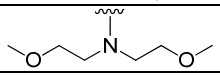
Los resultados de la Tabla 5.2 indican que en muchos casos los ligandos podrían tener igual preferencia por PAS y CAS en AChE, por lo que nuestros resultados predicirian afinidades similares para ambos sitios. Para ayudar a dilucidar el sitio de unión de estos ligandos hemos

150. M. Mazzei, E. Niueddu, M. Miele, A. Balbi, M. Ferrone, M. Fermeglia, M.T. Mazzei, S. Pricl, P. La Colla, F. Marongiu, C. Ibba, R. Loddo. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2591-2605

realizado ensayos en BuChE. Tal como habíamos visto en la introducción de esta tesis, BuChE es una enzima que también participa en la hidrólisis de Acetilcolina.[46] Estructuralmente, BuChE posee un CAS homólogo al de AChE, pero su sitio periférico carece del par de residuos aromáticos que permiten el apilamiento π del ligando. Por lo tanto, el hecho de que los ligandos se unan a AChE pero no a BuChE (como en el presente caso) podría ser un indicador de que los ligandos se unen al AChE en PAS. Como se puede ver en la Tabla 5.4, únicamente **6**, **26** y **27** presentan un cierto porcentaje de inhibición, aunque a un nivel relativamente bajo para BuChE. En conjunto, esto nos indica que las cumarinas posiblemente se sitúen en el sitio periférico de AChE. Existen estudios[149] que indican que esta preferencia de enlace en el PAS puede deberse a motivos cinéticos: dado que el PAS se encuentra más cerca de la superficie de la enzima, las cumarinas se enlazan con éste en lugar de seguir internándose a través del canal hasta llegar las CAS. Los estudios citados han llevado a cabo mutaciones en el PAS de AChE que modifican los residuos clave de interacción, y para esos casos puede observarse cómo las cumarinas llegan al CAS.[149] Actualmente se están poniendo a punto ensayos de desplazamiento de *propidium*, un ligando específico para el PAS de AChE con objeto de corroborar el sitio de unión de nuestras cumarinas.[151]

Tabla 5.4.- Valores experimentales de inhibición para el conjunto de cumarinas sintetizadas.



Candidato	R	Ee AChE	Hs BuChE	Aβ (1-40)	BACE
		IC_{50} (μM)	%Inh. @ 10μM	%Inh. @ 100μM	%Inh. @ 1mM
5		6.5±0.8	0	20±4	27.91
6		6.0±0.6	11±1	6±2	23.00
10		7.9±0.7	0	33±4	23.69
17		7.7±0.1	0	0	27.07
25		5.8±1.6	0	0	21.13
26		7.3±1.1	12±3	5±4	27.26
27		5.1±1.6	13±4	4±1	21.63

En relación a los resultados del ensayo de ThT para la inhibición de la agregación de Aβ-40, éstos indican que nuestros candidatos no superan el 35% de inhibición de la formación de fibrillas a nivel de 100 μM. Ese es un nivel similar al observado para la antraquinona (33% a 100 μM).[35] Los resultados de nuestras simulaciones (Figura 5.8) indican que el ligando de

151 P. Taylor, J. Lwebuga-Musaka, S. Lappi, J. Rademacher. *Mol. Pharmacol.* **1974**, *10*, 703-708

referencia es el que inhibe con más potencia la formación del bucle, seguido del compuesto **5**. Como habíamos indicado anteriormente, los bucles del tipo giro beta (β-turn) serían los núcleos de la formación de agregados amiloides. En todo caso, la correlación entre los resultados experimentales y los observados no es completa. Por ejemplo, el compuesto **10**, que experimentalmente presenta la mayor actividad anti-agregación, no desfavorece la formación de bucle. Esta discrepancia con los resultados obtenidos en nuestras simulaciones puede deberse a que las medidas experimentales emplean el método de la Tioflavina T, que determina agregación de fibrillas, mientras que nuestros cálculos estimán el efecto de nuestros ligandos sobre la etapa inicial de oligomerización. Existen estudios[146] que indican que la formación de fibrillas y la formación de oligómeros no necesariamente emplean el mismo mecanismo de formación, si bien como habíamos discutido en la introducción de la tesis las primeras pueden actuar como repositorios de los segundos. Por lo tanto, la formación de oligómeros y la formación de fibrillas, aunque relacionadas entre sí, no son completamente dependendientes, lo que explicaría las discrepancias entre las pruebas experimentales y las simulaciones de dinámica molecular.

5.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. CARBAZOLES.

Se ha encontrado que algunos compuestos que contienen en su estructura un carbazol o un análogo de éste presentan propiedades neurogenerativas y neuroprotectoras. Un ejemplo es el dimebon o Latrepirdina (Figura 5.10), un fármaco antihistamínico que había sido recientemente identificado como un compuesto cabeza de serie para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, aunque no superó la fase 3 de los estudios clínicos.[152] McMillan y colaboradores han llevado a cabo un estudio de relación estructura-actividad en variantes de dimebon, y han encontrado que muchos de los compuestos resultantes, con la estructura genérica X indicada en la Figura 5.10, presentan propiedades neuroprotectoras y neurogenerativas en ratones.[153] Sin embargo, todavía no se han identificado las dianas biomoleculares cuya modulación por parte de estos compuestos originan los efectos terapéuticos descritos. Una posible explicación de la actividad de los compuestos de tipo X es que éstos se unan a una o varias de las dianas de la cascada amiloide. Como se puede ver en la Figura 5.10, los compuestos de tipo X presentan varias de las características estructurales necesarias para ser inhibidores multidiana de las dianas estudiadas. Por un lado, la existencia de un grupo hidroxietilamina, presente en nuestro farmacóforo de BACE-1, los convierte en candidatos a inhibidores de BACE-1. Por otra parte, los grupos aromáticos (el carbazol y los grupos fenilo en los extremos de la molécula) podrían ser la base de la unión de estos compuestos a AChE y a péptidos Aβ.

152. S. Zhang, L. Hedskog, C.A. Hansson Petersen, B. Winblad, M. Ankarcrona. *J. Alzheimer's Diease* **2010**, *21*, 389-402
153. K.S. McMillan, J. Naidoo, J. Liang, L. Melito, N.S. Williams, L. Morlock, P.J. Huntingon, S.J. Estill, J. Longgood, G.L. Becker, S.L. McKnight, A.A. Pieper, J.F. de Brandaber, J.M. Ready. *J. Am. Chem. Soc* **2011**, *133*, 1428-1437

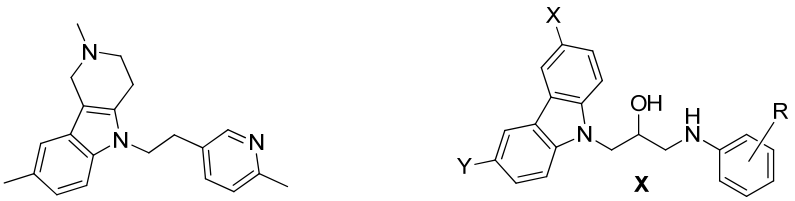


Figura 5.10.- *Izquierda*: Estructura de la Latrepirdina (Dimebon) *Derecha*: Estructura genérica de los derivados de carbazol estudiados por McMillan y col.[153]

5.4.1.- Resultados de acoplamiento en BACE-1.

En un principio, llevamos a cabo los estudios sobre algunos de los derivados de carbazol de estructura genérica tipo X (Figura 5.10) que incluyen un fragmento de anilina sustituida. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 5.5. Para este tipo de compuestos, elegimos para el centro estereogénico la conformación "*R*", de manera análoga a los inhibidores de BACE-1 conocidos que contienen el motivo hidroxietilamina (como el complejo de PDB id. 2B8L, Figura 5.1, Página 97). La elección de las poses no solo se basó en los valores obtenidos por las funciones de evaluación, sino también en un paradigma estructural descrito por el farmacóforo propuesto (sección 5.2.2.1). Como hemos explicado en dicha sección, dado que ahora nos encontramos ante compuestos con un mayor tamaño y flexibilidad, hemos empleado un margen de búsqueda de *hits* de las 10 poses que presentan un valor de función de evaluación más alto.

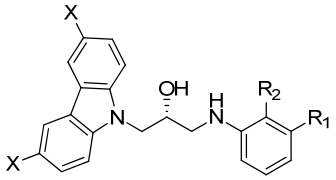
Un análisis de los resultados obtenidos para los compuestos estudiados (Tabla 5.5, resumidos en la Figura 5.11) muestra cómo aquellos con un sustituyente metoxilo en la anilina, tanto en posición *orto* (**31d**) como en posición *meta* (**32d**) son los que presentan un mayor consenso como posibles inhibidores de BACE-1. Estos mejores resultados podrían deberse al menor grado de colisiones estérticas, dado que son los candidatos menos voluminosos de los estudiados. De igual modo, nuestros cálculos indican que estos compuestos más pequeños se pueden enlazar a BACE-1 a cualquiera de los tres intervalos de apertura de *flap*. Además, se puede observar como, a excepción de los compuesto **31e** y **32d**, no se obtienen *hits* para los candidatos cuando éstos se encuentran en estado de protonación neutro, lo que coincide con nuestros estudios previos que indican que hay un enriquecimiento en el número de poses predichas cuando el ligando se encuentra cargado.[81, 154]

En disolución, el pK_a del acido conjugado de la anilina es 4.87, un valor muy cercano al pH óptimo de la actividad de la enzima, al cual se realizan los ensayos de afinidad de los inhibidores. Nuestros estudios de autoacoplamiento, presentados en el capítulo anterior,[154] indican que el sitio activo provee un entorno polar que favorece la protonación de inhibidores titulables, como es el caso de las anilinas empleadas en el presente estudio. Sin embargo, incluso contando con el efecto del microentorno polar, la basicidad de las anilinas puede no ser suficiente para promover el enlace con BACE-1 en la superficie de la membrana celular. Además, incluso en el interior de los endosomas, donde el pH alcanza valores más ácidos, un porcentaje significativo de las anilinas en el medio permanecerían en estado neutro. Por ello, decidimos estudiar un grupo de análogos basados en bencilamina, un grupo más básico que la anilina, que debería mejorar la probabilidad de formar complejos con BACE-1 a ambos valores

154. J.L. Domínguez, M.C. Villaverde, F. Sussman. *J. Comp. Aid. Mol. Design* **2013,** *27,* 403-417

de pH y por tanto mejorar la actividad a nivel enzimático. Para estos compuestos evaluamos de manera adicional el efecto de la estereoisomería del grupo hidroxilo en los resultados de acoplamiento. Los resultados obtenidos para las bencilaminas sustituidas en *orto* y meta se presentan en las Tablas 5.6 y 5.7, respectivamente, y se pueden ver resumidos de manera gráfica en las Figuras 5.12 y 5.13.

Tabla 5.5.- Resultados de Acoplamiento en BACE-1 para carbazoles con *orto*- y *meta*-anilinas.



31a: X = H, R_1 = H, R_2 = OMe
31b: X = H, R_1 = H, R_2 = OBn
31c: X = H, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
31d: X = Br, R_1 = H, R_2 = OMe
31e: X = Br, R_1 = H, R_2 = OBn
31f: X = Br, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
32d: X = Br, R_1 = OMe, R_2 = H

Candidato		**Función de Evaluación**[a]								
		ChemScore			***GoldScore***			***ChemPLP***		
		Abto	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**
31a	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	37.2 (01/5)	--	--	--	--	--	--
31b	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	--	75.7 (01/8)	--	--	--	--	92.8 (02/3)
31c	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	46.4 (01/4)	--	--	--	--	--	90.4 (01/2)
31d	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	32.3 (01/2)	--	--	57.7 (02/2)	--	70.9 (01/4)	82.46 (01/1)	--	--
31e	Neut	--	--	--	68.08 (05/1)	65.06 (05/2)	73.15 (05/3)	--	--	--
	Prot	--	--	43.1 (03/1)	81.9 (01/1)	--	--	--	--	--
31f	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	--	84.7 (01/1)	--	--	--	--	--
32d	Neut	28.50 (10/1)	--	--	--	58.16 (01/1)	--	--	--	--
	Prot	35.94 (01/2)	33.81[b] (01/1)	40.01 (01/3)	--	--	71.02 (03/1)	--	--	80.80 (02/1)

* Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (abto), apertura media (med), y cerrado (crdo), y los dos estados de protonación del ligando. [b]Contacto inverso al mostrado en Esquema 5.1 (N enlazado con Asp32, O enlazado con Asp228).

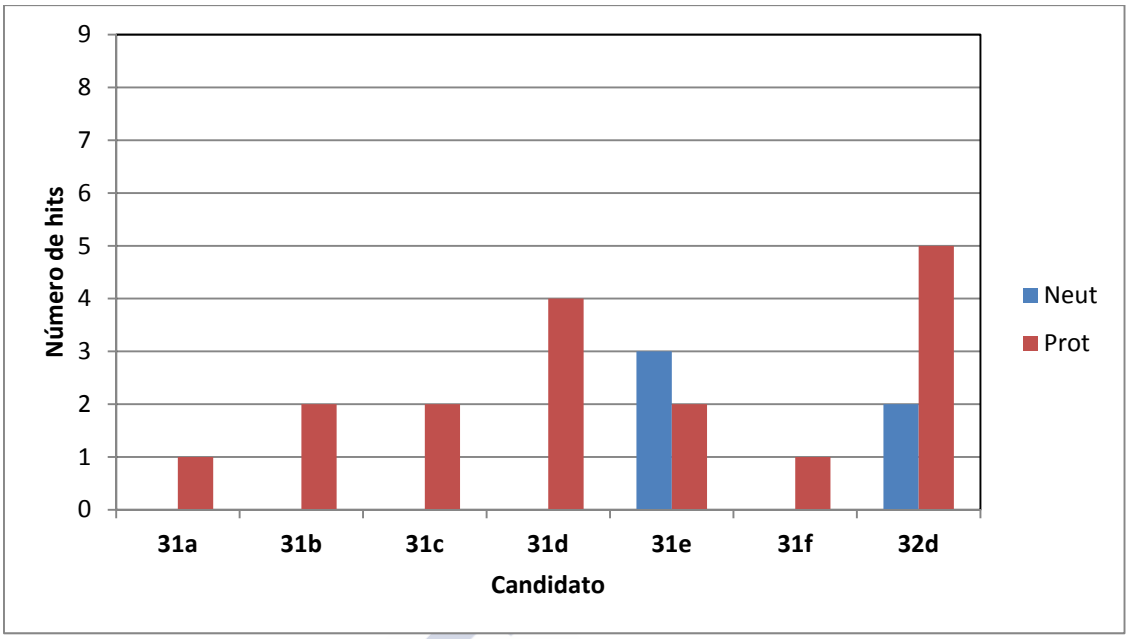
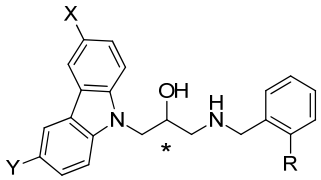


Figura 5.11.- Resultados de *hit* globales para BACE-1 de los derivados de carbazol sustituidos con anilinas.

La comparación entre los resultados de las anilinas (Tabla 5.5) y los de las bencilaminas (Tablas 5.6 y 5.7) indica que este último tipo de sustitución incrementa la frecuencia de *hits*. Se observa también un mayor número total de *hits* cuando el sustituyente de la bencilamina protonada está en disposición *orto,* en comparación con la sustitución *meta*, lo que indica cierta predilección por el primer tipo de sustitución cuando los compuestos interaccionan con BACE-1. Además, se puede ver en la Tabla 5.7 cómo los mejores resultados de acoplamiento proteína-ligando, en el caso de las bencilaminas, también se obtienen cuando se asume un estado protonado de la amina, un resultado que se muestra de acuerdo con los estudios previos de autoacoplamiento realizados en nuestro laboratorio, descritos en el capítulo 4.[154] Los datos son menos claros a la hora de determinar efectos de la estereoisomería sobre la afinidad. Así por ejemplo, para las *meta*-bencilaminas con dos bromos (**34e** y **34f**) se favorece la configuración *R*, mientras que sus equivalentes hidrogenados (**34b** y **34c**) favorecen la configuración opuesta (*S*). Ninguno de estos patrones se observa para los compuestos con *orto*-bencilaminas.

Tabla 5.6.- Resultados de acoplamiento en BACE-1 para carbazoles con *orto*-bencilaminas protonadas.



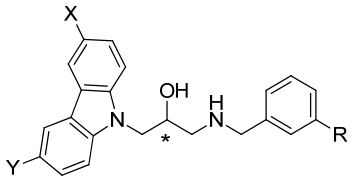
33a: X = H, Y = H, R = OMe
33b: X = H, Y = H, R = OBn
33c: X = H, Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
33d: X = Br, Y = Br, R = OMe
33e: X = Br, Y = Br, R = OBn
33f: X = Br, Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
33g: X = Br, Y = Me, R = OBn
33h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidato		Función de Evaluación*								
		ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
		Abto	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**
33a	R	35.5 (01/1)	--	--	69.5 (01/1)	59.1 (01/1)	65.5 (03/2)	--	72.0 (02/1)	--
	S	30.86 (04/7)	31.72[b] (04/3)	--	--	70.42[b] (01/4)	--	67.60 (01/1)	--	--
33b	R	39.7 (01/8)	--	--	--	--	76.9 (01/2)	--	77.8 (02/1)	86.1 (01/1)
	S	--	37.66[b] (02/3)	34.51[b] (04/1)	63.73 (05/1)	76.09 (01/1)	--	--	--	--
33c	R	40.1 (01/6)	40.3 (02/1)	--	72.6 (03/1)	66.3 (01/1)	--	82.8 (01/1)	80.1 (02/1)	93.6 (01/1)
	S	37.58[b] (01/4)	32.80 (03/2)	--	60.20 (08/2)	60.39 (08/1)	--	78.84[b] (01/1)	--	--
33d	R	34.7 (01/3)	34.4 (01/1)	41.0 (03/1)	--	56.8 (02/2)	--	--	--	--
	S	33.86 (03/3)	35.53[b] (05/1)	--	--	57.83 (03/3)	78.39 (01/1)	--	--	--
33e	R	35.7 (03/1)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	32.95 (02/2)	32.85 (06/1)	--	63.15 (01/1)	56.92 (01/1)	66.58[b] (01/1)	68.49 (07/1)	72.40 (07/1)	--
33f	R	37.7 (01/1)	--	--	71.6 (01/1)	66.4 (01/1)	--	--	--	95.2 (01/1)
	S	39.94[b] (01/1)	38.95 (02/1)	--	65.74 (04/1)	--	68.89 (01/1)	--	--	--
33g	R	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	34.55[b] (01/3)	38.85[b] (01/2)	--	58.58 (10/1)	70.76 (03/1)	--	--	--	--
33h	R	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	--	36.21[b] (04/1)	--	68.41 (03/2)	--	--	--	--	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (Abto), apertura media (Med), y cerrado (Crdo) y los dos isómeros del ligando. [b]Contacto inverso al mostrado en Esquema 5.1 (N enlazado con Asp32, O enlazado con Asp228).

Siguiendo con la comparación de los resultados obtenidos para los compuestos bencilamina sustituidos en *orto* (Tabla 5.6) con los resultados obtenidos para sus análogos sustituidos en *meta* (Tabla 5.7), se puede observar en ambos casos un mayor número de resultados de *hits* cuando el *flap* está abierto y/o con apetura media, y apenas sí se observan *hits* con el *flap* cerrado para *ChemScore* y *GoldScore*. Para el caso de *ChemPLP*, se observan escasos *hits*, independientemente del grado de apertura del *flap*.

Tabla 5.7.- Resultados de acoplamiento en BACE-1 para carbazoles con *meta*-bencilaminas.



34a: X = H, Y = H, R = OMe
34b: X = H, Y = H, R = OBn
34c: X = H, Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
34d: X = Br, Y = Br, R = OMe
34e: X = Br, Y = Br, R = OBn
34f: X = Br, Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
34g: X = Br, Y = Me, R = OBn
34h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidato			Función de Evaluación*								
			ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
			Abto	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**
34a	R	Neut	34.1 (01/1)	34.8 (03/1)	--	58.5 (02/1)	52.9 (01/2)	54.8 (06/1)	--	--	--
	S	Neut	32.3 (08/2)	34.3 (06/1)	--	--	--	50.6 (09/1)	--	--	--
	R	Prot	33.7 (01/5)	--	--	--	--	60.8 (05/2)	--	--	76.7 (01/1)
	S	Prot	35.0 (01/6)	34.3 (02/2)	30.4 (02/1)	58.1 (03/4)	--	61.1 (04/1)	--	--	--
34b	R	Neut	--	--	29.93[b] (07/1)	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	36.91 (02/2)	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	--	--	--	76.0[b] (04/1)	--	--
	S	Prot	--	37.67 (07/1)	--	--	64.77 (01/1)	--	--	--	--
34c	R	Neut	34.94 (07/1)	--	--	68.48 (05/2)	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	61.95 (07/3)	--	--	--	--	--
	R	Prot	33.27 (07/2)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	35.32 (04/1)	42.22 (01/1)	--	70.96 (02/4)	--	--	--	--	--
34d	R	Neut	--	32.4 (04/2)	--	54.1 (10/1)	--	--	--	--	--
	S	Neut	33.8 (01/2)	33.2 (04/1)	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	29.9 (06/3)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	33.8 (02/4)	31.2 (02/1)	--	60.2 (01/3)	56.6 (10/1)	--	--	--	--
34e	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	36.54 (01/1)	--	--	70.85 (03/1)	--	--	--	--	--
	R	Prot	37.13 (02/2)	--	38.33 (01/1)	64.56 (06/2)	62.53[b] (07/1)	61.61 (07/1)	--	--	--
	S	Prot	--	38.1[b] (02/1)	--	--	72.67 (01/1)	--	--	--	--
34f	R	Neut	35.23 (04/1)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	61.86 (08/1)	--	--	--	--
	R	Prot	33.45 (08/2)	33.89 (07/1)	32.10[b] (07/1)	--	--	72.01 (04/1)	--	--	--
	S	Prot	37.32 (01/3)	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 5.7. (Cont). Resultados de Acoplamiento en BACE-1 para carbazoles con *meta*-bencilaminas.

Candidato			Función de Evaluación								
			ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
			Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo
34g	R	Neut	38.17 (01/1)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	65.74 (05/1)	--	--	--	--	--
	R	Prot	39.41 (01/2)	--	--	--	66.20 (03/2)	--	--	--	--
	S	Prot	--	--	39.86 (01/1)	--	--	--	--	--	--
34h	R	Neut	--	--	--	--	64.34[b] (10/1)	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	34.65 (05/2)	36.88 (02/2)	--	--	67.93 (02/1)	--	--	--	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (Abto), apertura media (Med), y cerrado (Crdo), los dos isómeros del ligando y los dos estados de protonación. [b]Contacto inverso al mostrado en Esquema 5.1 (N enlazado con Asp32, O enlazado con Asp228).

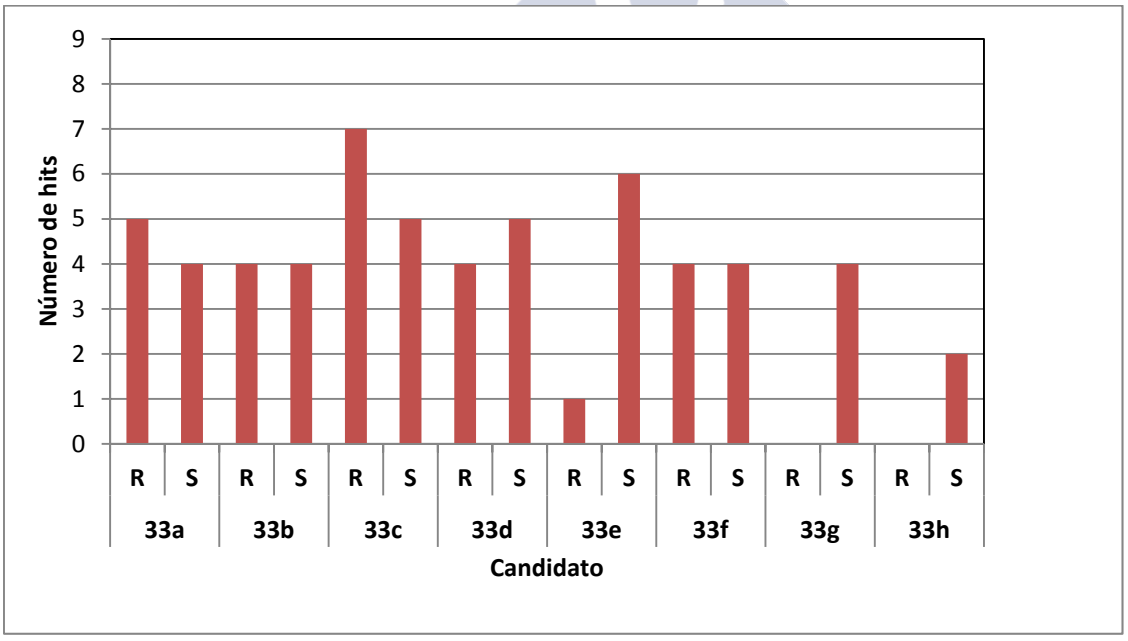


Figura 5.12.- Resultados de *hit* globales para BACE-1 de los derivados de carbazol sustituidos con *orto*-bencilaminas.

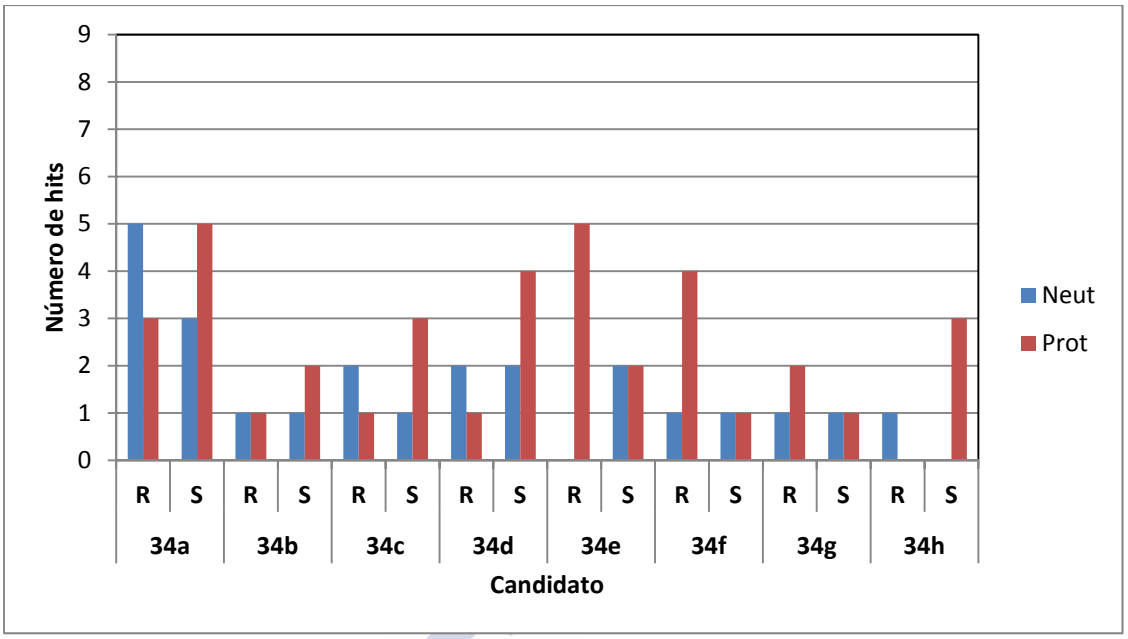


Figura 5.13.- Resultados de *hit* globales para BACE-1 de los derivados de carbazol sustituidos con *meta*-bencilaminas.

La Figura 5.14 muestra la pose obtenida con el valor más alto según la función de evaluación *ChemScore* para el ligando (*S*)-**34b** en los estudios de acoplamiento de los carbazoles en BACE-1, cuando el *flap* que cubre el sitio de enlace con apertura media. Como se observa en esta figura el ligando interactúa con la Tyr 71, uno de los residuos que constituye el *flap*. Por otro lado se pueden observar las interacciones de enlace de hidrogeno entre los grupos amino e hidroxilo del ligando con los residuos Asp 228 y Asp 32, componentes de la díada catalítica, de acuerdo con el farmacóforo descrito en el Esquema 5.1.

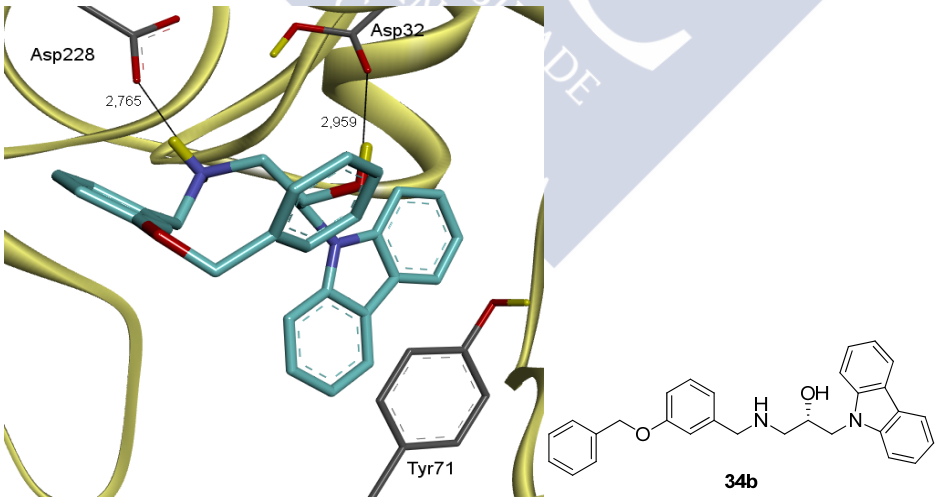


Figura 5.14.- Disposición del ligando **34b** en BACE-1. Los resultados fueron obtenidos con la función *ChemScore*, con la diana proteica con apertura media del *flap*.

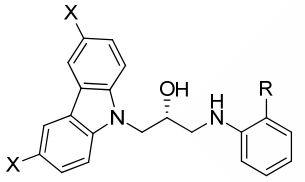
Los resultados presentados en las Tablas 5.5, 5.6 y 5.7 indican que los análogos de carbazol con un fragmento de bencilamina sustituido en *orto* presentan un mayor número de *hits* que sus análogos con un fragmento de anilina sustituido en *orto*, con la excepción del par **31e**-**33e**, donde el compuesto de bencilamina con estereoisomería *R* muestra un único *hit* comparado con los tres *hits* que se observan para el compuesto de anilina. En los compuestos con

bencilaminas sustituidas en *meta* se reducen sustancialmente los *hits* con *ChemPLP*, en comparación con otras técnicas de evaluación, cosa que no ocurre para los compuestos equivalentes con sustición en *orto*.

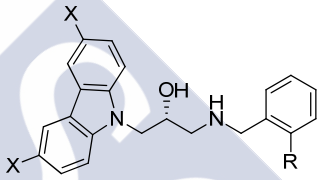
5.4.2.- Resultados de Acoplamiento en Acetilcolinesterasa.

Los resultados de acoplamiento a AChE de los candidatos derivados de carbazol se presentan en las Tablas 5.8 y 5.9, y se resumen de manera gráfica en las Figuras 5.15 y 5.16, respectivamente. Los resultados de acoplamiento para los compuestos que contienen un fragmento de anilina o bencilamina sustituidos en *orto* se presentan en la Tabla 5.8, mientras que los que contienen un fragmento de bencilamina sustituidos en *meta* están listados en la Tabla 5.9. La comparación de estos resultados de acoplamiento en AChE de estos compuestos con los obtenidos en el acoplamiento de ligandos en BACE-1 (ver Tablas 5.5, 5.6 y 5.7), indica que el número de *hits* predichos para AChE es sustancialmente superior a los predichos para BACE-1, lo que podría indicar que hay menos obstáctulos a la hora de encontrar candidatos que cumplan los requisitos estructurales para interactuar con AChE.

Tabla 5.8.- Resultados de Acoplamiento en AChE de los carbazoles. (orto-anilinas y orto-bencilaminas).



31a: X = H, R = OMe
31b: X = H, R = OBn
31c: X = H, R = OCH_2CH_2Ph
31d: X = Br, R = OMe
31e: X = Br, R = OBn
31f: X = Br, R = OCH_2CH_2Ph



33a: X = H, R = OMe
33b: X = H, R = OBn
33c: X = H, R = OCH_2CH_2Ph
33d: X = Br, R = OMe
33e: X = Br, R = OBn
33f: X = Br, R = OCH_2CH_2Ph

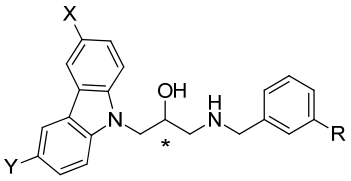
Candidato	Función de Evaluación[a]		
	ChemScore	*GoldScore*	*ChemPLP*
31a	51.7 (01/2)	--	112.4 (01/2)
31b	63.2 (01/2)	--	137.5 (01/2)
31c	64.6 (01/1)	96.9 (01/1)	143.2 (01/2)
31d	54.1 (01/4)	84.2 (03/4)	118.5 (01/7)
31e	63.0 (02/1)	102.4 (03/2)	144.8 (01/4)
31f	67.6 (02/5)	97.8 (03/2)	147.7 (01/4)

Candidato	Función de Evaluación[a]		
	ChemScore	*GoldScore*	*ChemPLP*
33a	54.7 (01/4)	86.4 (01/5)	122.3 (01/6)
33b	65.6 (01/2)	97.8 (02/2)	141.5 (01/4)
33c	65.2 (01/4)	104.4 (01/2)	140.8 (01/4)
33d	56.4 (01/5)	93.3 (01/5)	121.7 (01/6)
33e	65.9 (01/4)	107.5 (02/2)	134.5 (02/4)
33f	69.9 (01/3)	113.3 (01/4)	145.8 (01/4)

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras.

Los resultados de los derivados sustituidos en *orto* (Tabla 5.8) señalan que los compuestos más grandes, como **31e** y **31f** (aquellos que poseen un sustituyente benciloxilo o feniletoxilo) presentan resultados de función de evaluación más elevados. Cuando se comparan las poses de salida de estos compuestos con las de aquellos que presentan un sustituyente metoxilo se observa que los primeros obtienen mejores resultados gracias a su capacidad para interaccionar simultáneamente con el PAS y el CAS de AChE.

Tabla 5.9.- Resultados de Acoplamiento en AChE de los carbazoles sustituidos con *meta*-bencilaminas.



34b: X = H, Y = H, R = OBn
34c: X = H, Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
34e: X = Br, Y = Br, R = OBn
34f: X = Br, Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
34g: X = Br, Y = Me, R = OBn
34h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidato			Función de Evaluación*		
			ChemScore	***GoldScore***	***ChemPLP***
34b	R	Neut	62.56 (01/3)	101.87 (01/3)	126.03 (02/6)
	S	Neut	61.16 (01/4)	105.07 (01/2)	134.79 (01/6)
	R	Prot	61.47 (01/4)	101.40 (04/2)	131.42 (03/5)
	S	Prot	64.75 (01/3)	104.23 (02/3)	132.19 (02/4)
34c	R	Neut	64.13 (01/3)	--	137.64 (01/4)
	S	Neut	61.47 (04/2)	97.98 (02/2)	136.59 (01/4)
	R	Prot	62.71 (01/2)	104.14 (02/1)	139.65 (01/4)
	S	Prot	61.92 (01/2)	92.44 (10/1)	137.09 (01/4)
34e	R	Neut	63.74 (02/4)	110.17 (01/3)	132.5 (01/4)
	S	Neut	64.74 (01/4)	106.44 (01/2)	129.99 (01/3)
	R	Prot	64.89 (01/4)	116.90 (02/2)	140.05 (01/6)
	S	Prot	63.67 (01/5)	107.86 (02/3)	131.31 (02/3)
34f	R	Neut	66.54 (01/4)	95.10 (09/1)	128.63 (04/2)
	S	Neut	64.58 (01/3)	--	135.90 (01/4)
	R	Prot	68.12 (01/3)	104.59 (02/2)	135.23 (01/2)
	S	Prot	65.90 (01/3)	108.56 (01/1)	135.76 (01/4)
34g	R	Neut	67.66 (01/4)	109.77 (03/3)	137.6 (02/3)
	S	Neut	65.98 (01/3)	101.28 (06/2)	135.84 (01/4)
	R	Prot	63.79 (03/4)	111.76 (02/4)	132.86 (02/6)
	S	Prot	65.39 (01/3)	97.61 (06/3)	131.29 (03/4)
34h	R	Neut	68.01 (01/2)	105.89 (01/2)	137.51 (01/5)
	S	Neut	68.21 (01/4)	105.08 (01/1)	133.63 (01/6)
	R	Prot	68.24 (01/1)	101.00 (01/1)	142.56 (01/3)
	S	Prot	66.77 (01/3)	105.64 (01/4)	137.83 (01/4)

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras, para los dos enantiómeros y los dos estados de protonación del ligando.

Como muestra la Figura 5.17, los compuestos que no tienen un sustituyente con un anillo aromático (**31a**, **31d**, **33a** y **33d,** donde R=OMe**)** interaccionan con el CAS mediante apilamiento π con los residuos Tyr84 y Phe330, pero no alcanzan el PAS de AChE y por tanto no generan este tipo de interacciones con Tyr70 y Trp279. Por este motivo, ya no se llevaron estudios de acoplamiento con este tipo de sustitución en las *meta*-bencilaminas.

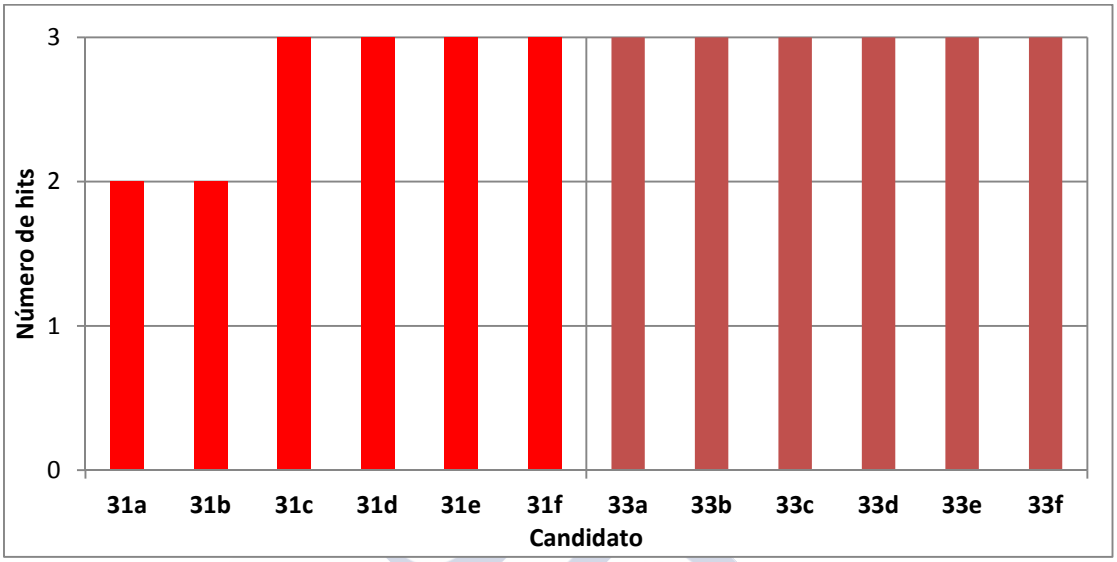


Figura 5.15.- Resultados de *hit* globales para AChE de los derivados de carbazol sustituidos con *orto*-anilinas y *orto*-bencilaminas.

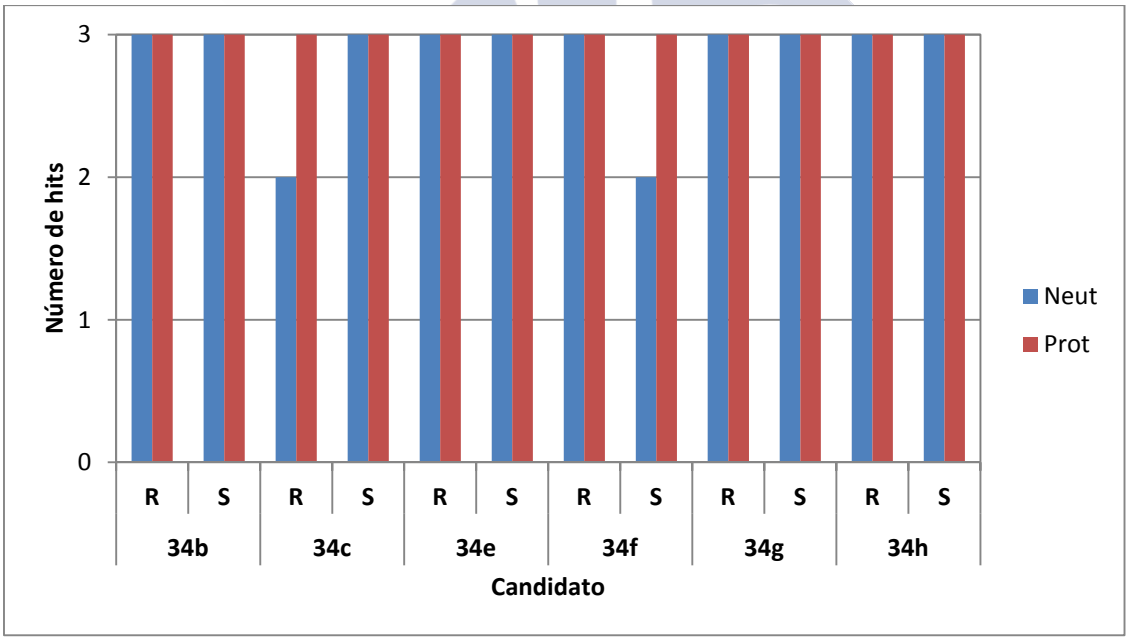


Figura 5.16.- Resultados de *hit* globales para AChE de los derivados de carbazol sustituidos con *meta*-bencilaminas.

El análisis comparativo del ranking de unión a AChE de los enantiómeros de los compuestos **34b** a **34h**, indica que, como en el caso de BACE-1, no existe una tendencia global de unión clara para ninguno de los centros estereogénicos. De la misma manera, un análisis comparativo de los valores de evaluación según la carga del inhibidor no muestra un patrón discernible a través de todos los ligandos.

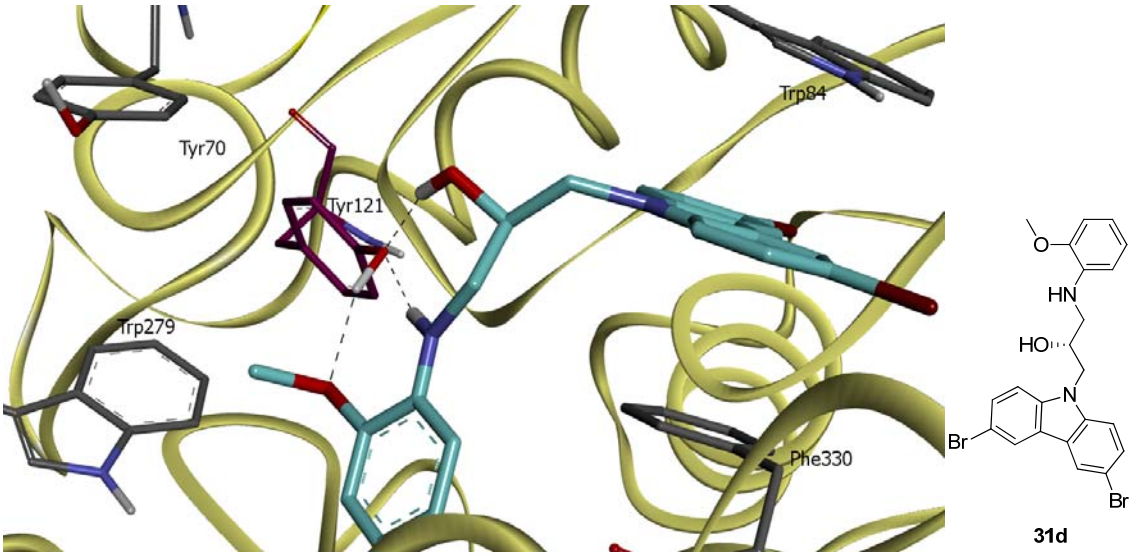


Figura 5.17.- Resultado de acoplamiento de **31d** en AChE, obtenido con la función *ChemPLP*.

La Figura 5.18 muestra el resultado de acoplamiento del compuesto **34b**, donde se pueden observar las interacciones de apilamiento π del ligando con residuos aromáticos en ambos sitios aniónicos (catalítico y periférico), además de las interacciones de enlace de hidrógeno del fragmento hidroxietilmina con el residuo Tyr121, situado en el canal que conecta ambos sitios. Como se puede ver en esta figura, la unidad aromática más voluminosa (el carbazol) se encuentra en el sitio catalitico (CAS). Una revisión de todas las poses de este tipo de compuestos indica que esta característica es común para todos los miembros de esta familia de ligandos, incluidos los compuestos con sustitución metoxilo.

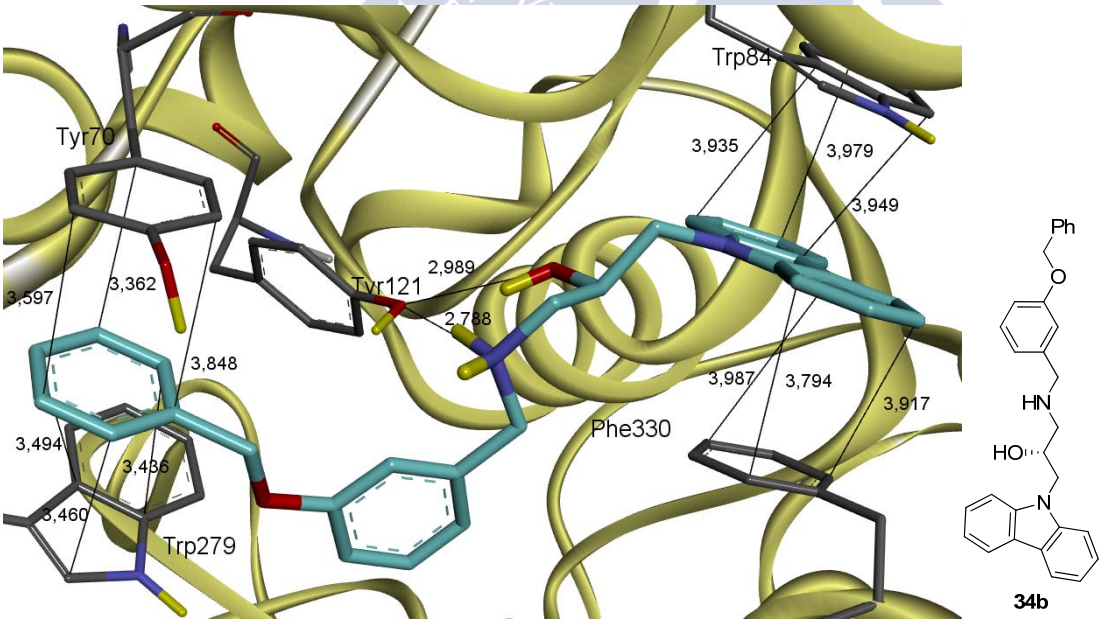


Figura 5.18.- Resultado de acoplamiento de **34b** en AChE, obtenido con la función *ChemScore*.

5.4.3.- Resultados de simulación de inhibición de agregación.

La Tabla 5.10, lista los tiempos de residencia de la 9-10 antraquinona (utilizada como compuesto de referencia) y de algunos de los compuestos que contienen un grupo carbazol a

una distancia máxima de 7.5 Å del péptido. También hemos calculado los tiempos de residencia de estos ligandos cerca de cada uno de los residuos del péptido con una distancia de corte de 4.5 Å (Figura 5.19), y el tiempo de interacción residuo-residuo en la presencia de ligandos (Figura 5.20). Como se puede ver en la Tabla 5.10, los compuestos candidatos tienen un tiempo de residencia mucho mayor que el ligando de referencia. De igual modo, los compuestos elegidos muestran una mayor preferencia por el clúster de histidinas (H13 y H14) en el extremo N-terminal del péptido y por el clúster aromático del segmento LVFAA del péptido (Figura 5.19).

Tabla 5.10.- Resultados de fracción de tiempo de contacto de los derivados de carbazol con el péptido Aβ12-28.

Candidato	Tiempo de contacto
31b	0.93
31c	0.90
31d	0.99
31f	0.99
Antraquinona	0.36

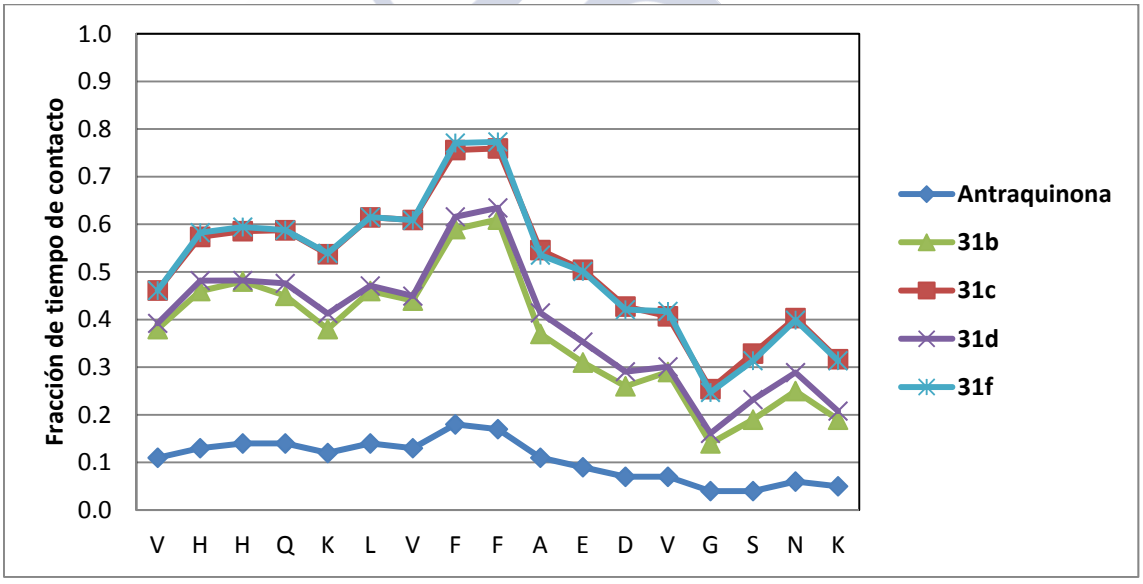


Figura 5.19.- Valores de fracción de tiempo de contacto de los residuos del péptido Aβ12-28 con los derivados de carbazol.

Como muestra la Figura 5.20, todos los compuestos estudiados son capaces de interferir la formación del bucle de contacto entre los residuos clave HQK (14-15-16) y VGS (24-25-26). Estos resultados sugieren que los derivados de carbazol son capaces de interumptir la formación de las horquillas en el péptido que actúan como núcleo en la agregación en láminas de Aβ-42, lo que indica que son candidatos adecuados a inhibidores de agregación.

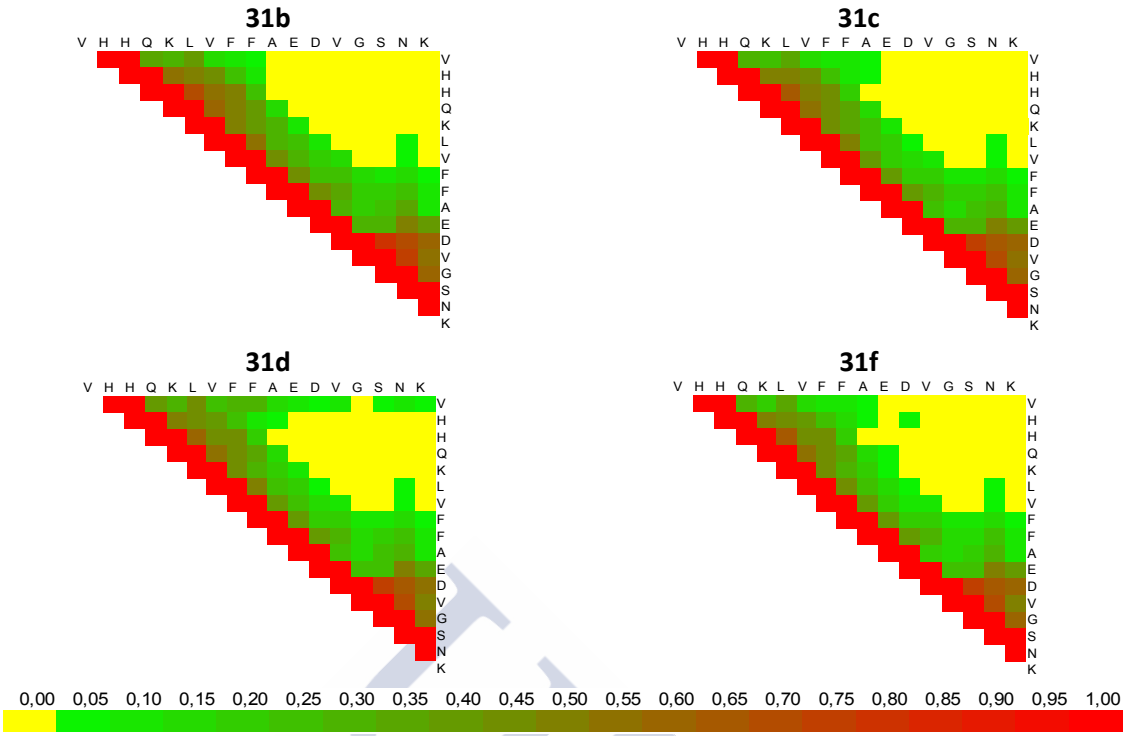


Figura 5.20.- Mapa de contactos de los residuos del péptido Aβ12-28 con el derivado de carbazol presente en el medio, según la escala de tiempos por color. No se muestra la diagonal.

La Figura 5.21 muestra un fotograma de la dinámica molecular del péptido en presencia del ligando. Como se puede observar en la figura, el grupo carbazol interacciona mediante apilamiento π con la cadena lateral del residuo Phe20.

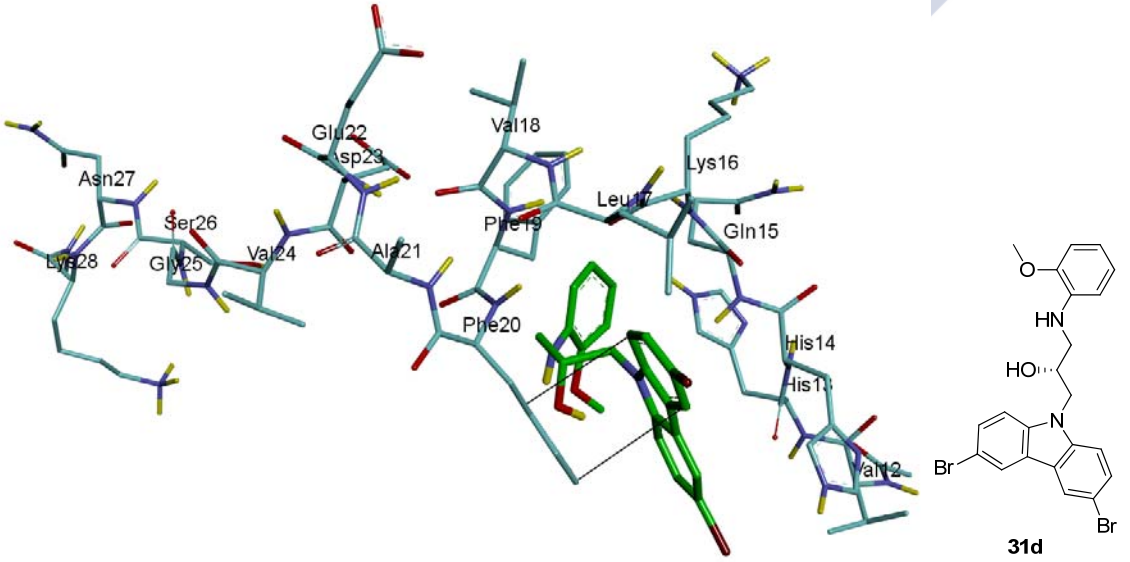
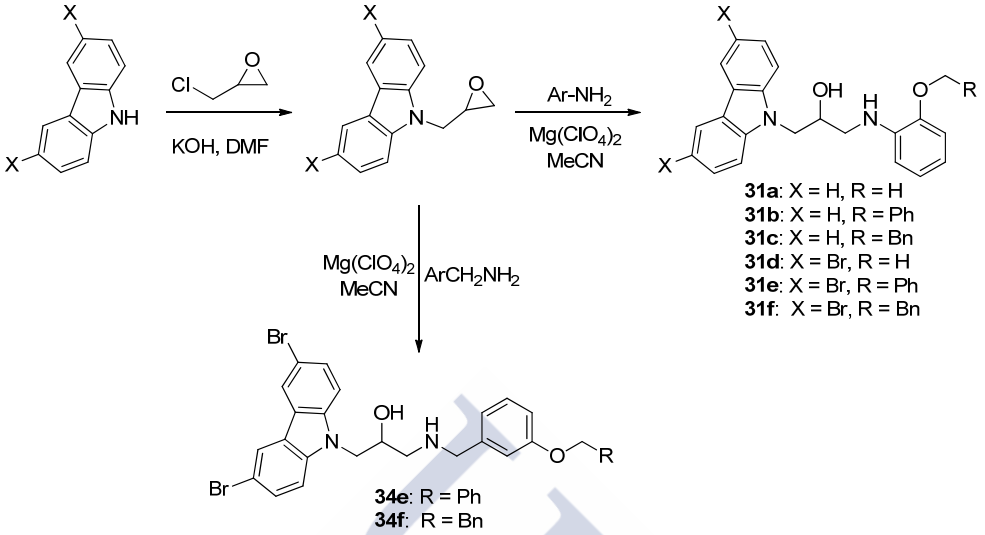


Figura 5.21.- Imagen extraída de una trayectoria de simulación de dinámica molecular del fragmento 12-28 de la cadena Aβ-42 (celeste) en un entorno con el candidato **31d** (verde).

5.4.4.- Sintesis de Carbazoles.

Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos derivados de carbazol se empleó el procedimiento indicado en El Esquema 5.3, que también ilustra las estructuras de los compuestos sintetizados. La elección de los compuestos se basó en algunos de los casos por la

disponibilidad de los reactivos. Si bien los resultados para BACE-1 indican que los compuestos de bencilamina sustituidos en *orto* muestran un mayor consenso que sus equivalentes en *meta*, requieren una química más elaborada y cara. Por este motivo, se sintetizaron los mejores candidatos con un sustituyente *meta*-bencilamina.



Esquema 5.3.- Esquema general de la síntesis de derivados de carbazol y compuestos sintetizados.

5.4.5.- Resultados Experimentales.

Los resultados experimentales de los ensayos de inhibición de los carbazoles sintetizados se presentan a continuación en la Tabla 5.11. Como se puede ver en dicha tabla, algunos de los compuestos con un fragmento de anilina muestran cierto potencial de inhibición multidiana. Por ejemplo, los compuestos **31e** y **31f** poseen afinidad micromolar por AChE y un porcentaje de inhibición de agregación cercano al 50% a concentración de 100μM. Por otra parte, el compuesto **31a** muestra inhición de BuChE a nivel micromolar, y un porcentaje de inhibición de formación de fibrillas del 58%. Aún así, ninguno de los derivados de carbazol sustituidos con anilinas resultaron en compuestos multidiana para las tres dianas de la cascada amiloide estudiadas en este trabajo.

Tabla 5.11.- Resultados experimentales de los derivados de carbazol.

Candidato	EeAChE		HsBuChE		AB(1-40)	BACE-1	
	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh. @10μM	IC_{50}(μM)	%Inh. @100μM	%Inh. @100μM	IC50(μM)
31a	30 ± 1	--	--	6.0±1.0	58 ± 2	1.3 ± 0.3	--
31b	22 ± 1	--	34 ± 1	--	51 ± 5	2.4 ± 1.4	--
31c	49 ± 2	--	33 ± 1	--	36 ± 5	1.5 ± 0.3	--
31d	15 ± 1	--	12 ± 1	--	41 ± 3	1.6 ± 1.5	--
31e	--	7.2 ± 0.4	20 ± 1	--	46 ± 3	0.5 ± 0.3	--
31f	--	7.8 ± 0.2	10 ± 1	--	49 ± 1	0.9 ± 0.9	--
34e	48 ± 1	--	--	1.1 ± 0.2	11 ± 3	--	3.1 ± 0.4
34f	--	14 ± 1	--	7.1 ± 0.7	28 ± 3	--	3.1 ± 0.3

Al comparar los resultados de los compuestos sustituidos con bencilaminas con los de las anilinas, se observa que la adición de un grupo CH_2 aumenta la afinidad por BACE-1 de los compuestos por más de tres órdenes de magnitud. Estos resultados experimentales respaldan las predicciones de nuestros cálculos (Tablas 5.5, 5.6 y 5.7), que indicaban que la adición de un fragmentos de CH_2 aumenta el número de *hits* en todas de las funciones de evaluación. Como

se había mencionado anteriormente, este efecto probablemente se deba al aumento en pK_a del grupo amino al pasar de anilina a bencilamina, lo que favorece la formación de pares iónicos con los residuos aspárticos de la díada catalítica de BACE-1. Sin embargo, aunque el compuesto **34e** muestra inhibición a nivel micromolar de BuChE, su capacidad de inhibición de AChE y la agregación se ven gravemente mermadas cuando se compara con **31e**, lo que implica que ninguno de los compuestos derivados de carbazol es un candidato ideal de inibidor multidiana para todas las dianas estudiadas.

5.5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN III. INDOLES.

El protocolo de acoplamiento presente en el programa GOLD, permite bajo ciertas condiciones que los átomos del ligando se acerquen a los de la proteína a distancias por debajo del radio de van der Waals, lo que resulta en una colisión estérica entre estos átomos ('*soft bumping*' en inglés). Los cálculos de GOLD permiten este tipo de acercamiento para compensar la falta de flexibilidad de proteína durante la simulación de acoplamiento. Durante nuestros estudios de docking, hemos observado en varias ocasiones este tipo de colisiones entre en ligando y la molécula de BACE-1. La Figura 5.22 ilustra un ejemplo de éste fenómeno, en una de las posiciones de salida del compuesto **33a**.

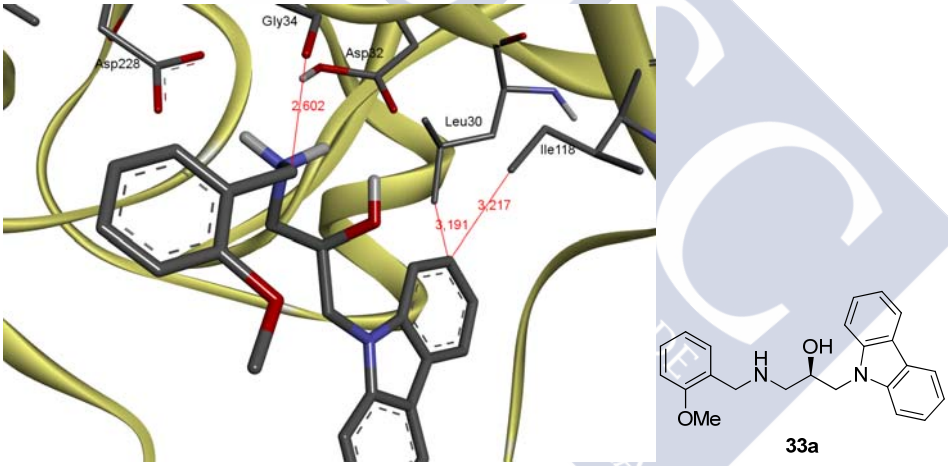


Figura 5.22.- Resultado de acoplamiento del compuesto **33a** en BACE-1, *flap* abierto, según *ChemScore*.

Como en el caso de BACE-1, para AChE también se observa la existencia de '*soft-bumping*' en varios de los resultados de acoplamiento de nuestros derivados carbazólicos sustuidos con bromo y/o metilo en el grupo carbazol. La Figura 5.23 ilustra un ejemplo de éste fenómeno en el acoplamiento del ligando **34e** en AChE. Se puede observar como uno de los sustituyentes bromo del carbazol se encuentra a una distancia de colisión estérica con un átomo de carbono de la cadena lateral de Ile439.

El grupo carbazol es un sustituyente muy voluminoso y rígido. El elevado número de choques estéricos observados nos indica que el grupo carbazol puede presentar problemas estéricos a la hora de inhibir las dianas enzimáticas de la cascada amiloide. Por lo tanto, decidimos sustituir el grupo carbazol por un sustituyente de menor tamaño como el indol, lo que en principio debería reducir la probabilidad de colisiones estéricas con las enzimas diana de la cascada amiloide. Además, para estos compuestos decidimos emplear un sustituyente bencilo

en la anilina/bencilamina, ya que los estudios previos de carbazoles parecer indicar que este grupo posee el tamaño adecuado para que el candidato a inhibidor alcance tanto el CAS como el PAS de AChE.

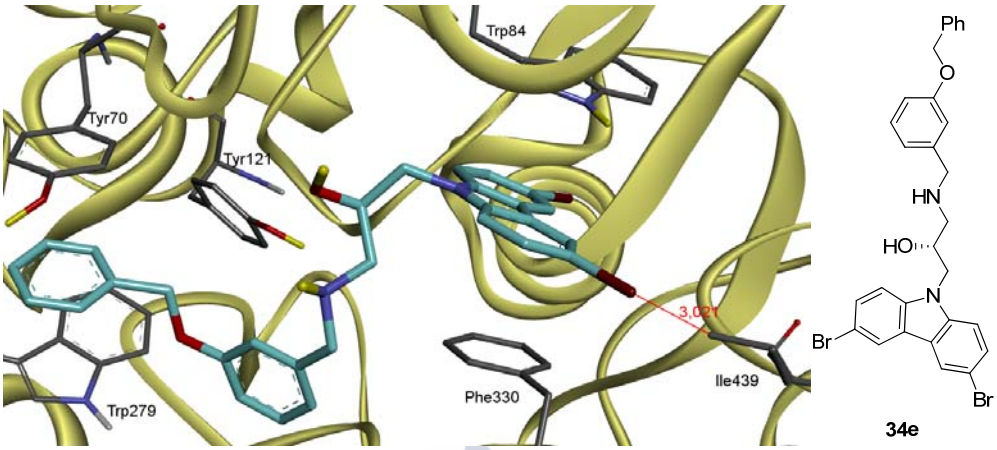


Figura 5.23.- Resultado de acoplamiento de **34e** en AChE, según *ChemPLP*.

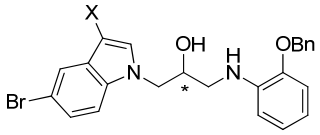
5.5.1.- Resultados de Acoplamiento en BACE-1.

Las Tablas 5.12 y 5.13 listan los resultados del acoplamiento a BACE-1 de los compuestos indólicos. Como en el caso de los carbazoles, estos resultados se resumen de manera gráfica en las Figuras 5.24 y 5.25 respectivamente. El mayor tamaño y flexibilidad de estos candidatos a inhibidor en comparación con las cumarinas nos ha llevado, como en el caso de los carbazoles, a buscar los *hits* entre los 10 primeros resultados mejor clasificados para cada función de evaluación y apertura del *flap*.

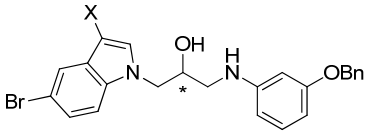
Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, las probabilidades de obtener *hit* se incrementan cuando el *flap* se encuentra total o parcialmente abierto (Tablas 5.12 y 5.13). El número de *hits* con *flap* cerrado es muy reducido; en particular, al emplear la función de evaluación *ChemPLP* no se observa ningún *hit*. Esto nos indica que las moléculas caben en el sitio activo de la enzima gracias a la flexibilidad del *flap*.

En el caso de los compuestos basados en carbazol, se observaba que los compuestos con mejores resultados eran aquellos que contenían una función bencilamina, que garantizaba la existencia de un grupo amino protonado. Una comparación general de los compuestos que contienen anilinas (Tabla 5.12, Figura 5.24) con los compuestos que contienen bencilaminas (Tablas 5.13, Figura 5.25) indican que estas últimas poseen una mayor frecuencia de *hit* global, de manera similar a los resultados obtenidos para los compuestos derivados de carbazol. Sin embargo, la sustitución más favorecida para las bencilaminas en los compuestos derivados de indol según nuestras predicciones difiere de la predicha para derivados de carbazol. Los derivados de carbazol muestran predilección por la sustitución en *orto* sobre la sustitución en *meta*. Sin embargo, una revisión de los resultados para los derivados de indol indica una mayor predilección por la sustitución en *meta* sobre la sustitución en *orto*, tanto para las anilinas como para las bencilaminas. Además, en el caso de las anilinas, el mayor incremento de *hits* al comparar aquellos compuestos sustituidos en *orto* con sus equivalentes en *meta* se observa cuando se hace el acoplamiento del ligando sin carga.

Tabla 5.12.- Resultados de acoplamiento en BACE-1 de derivados de indol sustituidos con anilina.



41a: X = H
41b: X = Br
41c: X = Me

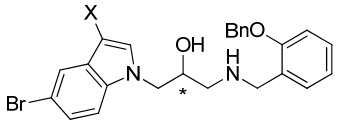


42a: X = H
42b: X = Br
42c: X = Me

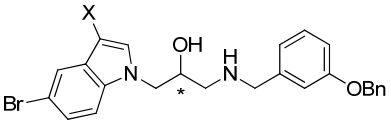
Candidato			Función de Evaluación[a]								
			ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
			Abto	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**	**Abto**	**Med**	**Crdo**
41a	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	60.59[b] (01/2)	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	60.84 (08/3)	61.05 (02/1)	--	--	77.9 (02/1)	--
	S	Prot	30.11 (10/1)	33.43[b] (02/1)	30.85 (02/1)	63.56 (02/5)	59.17 (09/2)	--	--	--	--
41b	R	Neut	--	--	--	57.92[b] (09/1)	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	30.51 (10/1)	--	--	64.78 (04/6)	--	--	--	71.62 (02/2)	--
	S	Prot	33.9 (01/1)	34.71 (03/5)	33.34 (03/1)	62.32 (07/1)	--	62.54 (02/1)	--	75.88 (03/1)	--
41c	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	31.27 (09/1)	--	--	60.00 (07/1)	56.90 (10/1)	--	--	74.21 (03/1)	--
	S	Prot	--	--	--	--	66.46 (02/1)	--	--	--	--
42a	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	74.79 (02/1)	--
	S	Neut	32.61 (01/4)	38.33 (01/1)	--	61.87 (04/1)	61.12 (01/2)	53.76 (07/1)	--	--	--
	R	Prot	32.18 (01/3)	34.11 (05/3)	--	--	--	--	--	71.66 (05/1)	--
	S	Prot	32.81 (01/4)	36.09 (03/2)	--	64.82 (04/1)	--	--	--	76.73 (03/1)	--
42b	R	Neut	34.24 (01/1)	33.78 (06/2)	31.30 (02/1)	--	57.00 (04/3)	--	--	--	--
	S	Neut	31.38 (04/1)	--	36.86 (01/2)		--	--	66.46 (10/1)	--	--
	R	Prot	32.08 (02/3)	33.84 (07/1)	--	58.13 (08/2)	--	--	67.90 (10/1)	--	--
	S	Prot	33.59 (01/3)	34.89 (07/1)	38.47 (01/1)	70.02 (01/4)	--	61.82 (07/1)	--	--	--
42c	R	Neut	--	35.76[b] (05/2)	--	63.72[b] (03/2)	61.00 (02/3)	--	--	69.75 (09/1)	--
	S	Neut	31.07 (05/1)	38.00 (02/1)	--	--	58.47 (03/3)	--	--	71.98 (05/1)	--
	R	Prot	31.17 (04/1)	36.23 (02/3)	29.48 (10/1)	63.58 (05/2)	59.36 (09/1)	--	--	--	--
	S	Prot	34.60 (01/3)	36.08 (02/1)	--	--	--	--	--	--	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit*. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (Abto), apertura media (Med), y cerrado (Crdo), los dos enantiómeros y los dos estados de protonación. [b]Contacto inverso al mostrado en Esquema 5.1 (N enlazado con Asp32, O enlazado con Asp228).

Tabla 5.13.- Resultados de acoplamiento en BACE-1 de derivados de indol sustituidos con bencilamina.



43a: X = H
43b: X = Br
43c: X = Me



44a: X = H
44b: X = Br
44c: X = Me

Candidato			Función de Evaluación[a]								
			ChemScore			*GoldScore*			*ChemPLP*		
			Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo	Abto	Med	Crdo
43a	R	Neut	35.40[b] (02/4)	35.10 (04/1)	--	62.21[b] (03/3)	64.69 (01/1)	--	--	74.42 (03/1)	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	74.44[b] (02/1)	--
	R	Prot	33.53[b] (02/3)	35.32 (02/2)	--	66.93 (03/1)	--	--	--	74.19 (05/1)	--
	S	Prot	33.04[b] (03/5)	35.34 (02/2)	--	--	62.97 (08/1)	--	--	--	--
43b	R	Neut	35.41[b] (01/3)	36.50 (02/2)	--	56.78 (08/3)	--	--	--	--	--
	S	Neut	33.86[b] (01/2)	--	--	55.01 (10/1)	--	--	--	--	--
	R	Prot	37.67[b] (01/1)	37.27 (02/2)	--	60.84 (10/1)	63.97 (02/1)	56.28 (10/1)	--	72.22 (05/2)	--
	S	Prot	32.13[b] (02/1)	35.10 (04/2)	--	62.46 (03/2)	61.69 (08/1)	68.65 (01/1)	--	--	--
43c	R	Neut	33.99[b] (03/3)	36.29[b] (03/2)	--	62.31 (07/1)	59.32 (05/9)	--	--	74.31[b] (03/3)	--
	S	Neut	33.94[b] (04/1)	37.21[b] (03/2)	--	62.65 (04/1)	--	--	--	--	--
	R	Prot	34.05[b] (01/3)	35.22 (04/4)	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	--	35.84[b] (03/3)	-	--	--	54.76 (09/1)	--	--	--
44a	R	Neut	36.08[b] (01/3)	37.96 (01/1)	--	--	--	--	74.27[b] (01/2)	--	--
	S	Neut	37.62[b] (01/2)	36.86[b] (02/3)	--	67.83[b] (03/1)	--	--	--	--	--
	R	Prot	33.38[b] (02/3)	37.82 (01/1)	--	--	63.97 (02/1)	61.31 (04/2)	71.73[b] (07/1)	83.70 (01/1)	--
	S	Prot	31.25[b] (10/1)	35.91[b] (02/3)	--	--	59.88 (04/1)	59.24[b] (08/2)	80.24[b] (01/2)	--	--
44b	R	Neut	38.27[b] (01/2)	35.74[b] (02/1)	31.11 (05/1)	64.54[b] (05/2)	--	--	70.36[b] (02/1)	--	--
	S	Neut	34.34[b] (02/2)	--	--	--	--	--	--	70.03[b] (03/1)	--
	R	Prot	33.82[b] (02/4)	33.66 (05/2)	29.07 (07/1)	67.87[b] (04/4)	59.89 (07/1)		--	--	--
	S	Prot	33.25[b] (04/2)	38.02 (01/2)	36.17 (02/2)	69.31[b] (01/1)	63.34 (02/1)	--	76.56[b] (01/2)	75.98[b] (02/1)	--
44c	R	Neut	34.00[b] (04/2)	35.69 (04/1)	--	67.07[b] (03/2)	--	--	74.20[b] (01/2)	--	--
	S	Neut	35.92[b] (01/3)	37.00[b] (01/2)	--	--	--	54.68[b] (07/1)	--	70.08[b] (08/1)	--
	R	Prot	38.00[b] (01/1)	37.85 (01/1)	--	64.84[b] (06/1)	--	59.93 (07/1)	--	70.07 (06/1)	--
	S	Prot	34.24[b] (02/2)	37.36 (02/3)	--	--	62.17[b] (08/2)	57.45 (09/1)	--	72.08 (07/1)	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de las diferentes funciones de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. El número entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo resultado de *hit*. Se indican los resultados para las tres posiciones del *flap*: abierto (Abto), apertura media (Med), y cerrado (Crdo), los dos enantiómeros y los dos estados de protonación. [b]Contacto inverso al mostrado en Esquema 5.1 (N enlazado con Asp32, O enlazado con Asp228).

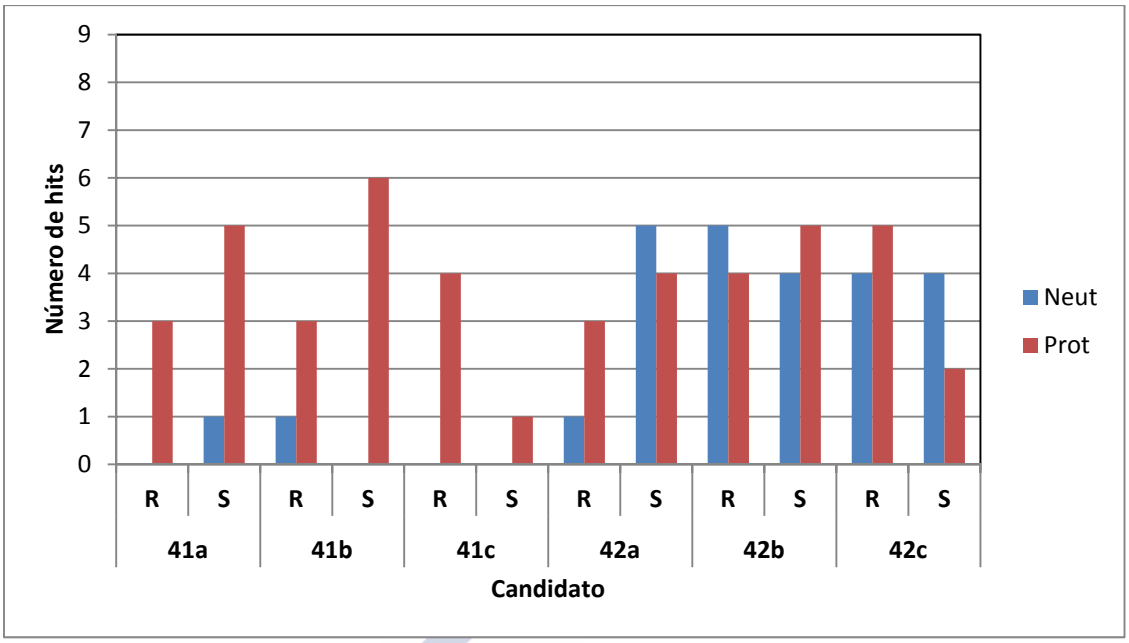


Figura 5.24.- Resultados de *hit* globales para BACE-1 de los derivados de indol sustituidos con anilinas.

El número de *hits* se incrementa (en su mayor parte) cuando el grupo amino se encuentra en estado protonado, en lugar de neutro, en línea con nuestros resultados anteriores. [154]

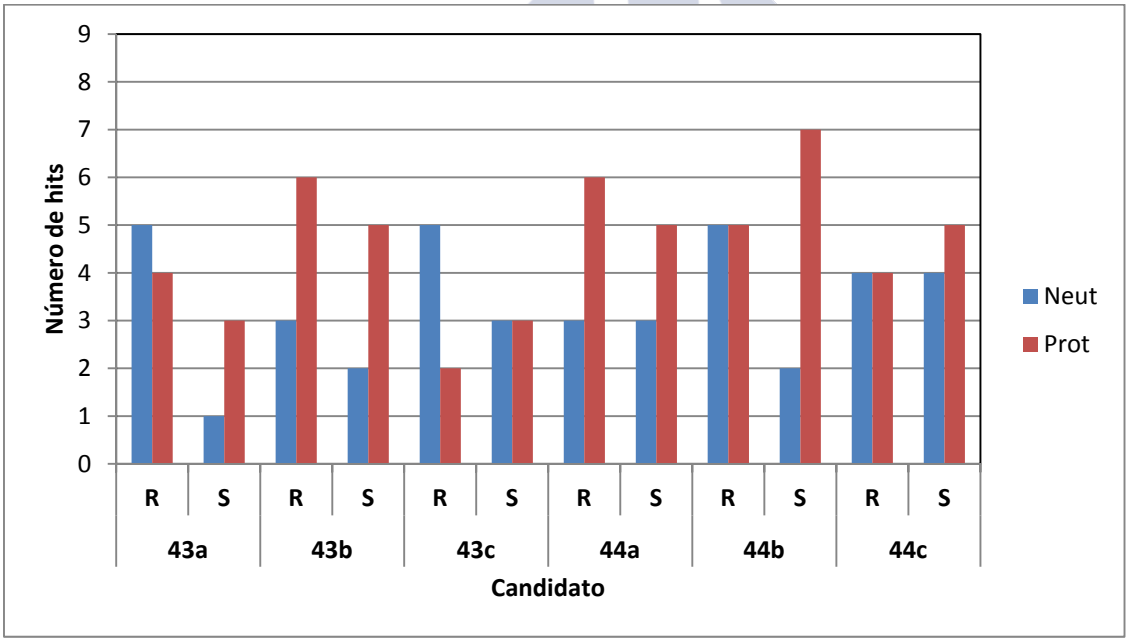


Figura 5.25.- Resultados de *hit* globales para BACE-1 de los derivados de indol sustituidos con bencilaminas.

La Figura 5.26 muestra una pose de *hit* para el compuesto **44a** protonado, con conformación *S,* obtenida para la diana proteica con flap de apertura media mediante la función de evaluación *ChemScore*. En la ilustración se indican los enlaces de la hidroxietilamina con la díada aspártica catalítica. Se pueden observar los enlaces de hidrógeno de Asp228 con la amina cargada, y Asp32 con el hidroxilo.

Cabe mencionar que, para los casos de los derivados de indol con un sustituyente de tipo bencilamina, se observa un elevado grado de disposición "inversa" de contacto entre la díada aspártica catalítica y el candidato cuando el *flap* se encuentra abierto, en particular en los resultados de la función de *ChemScore*. Entendemos como disposición "inversa" aquella en la cual la amina establece enlace de hidrógeno con el residuo aspártico protonado (Asp32) y el hidroxilo con el residuo aspártico cargado (Asp228), un grupo de interacciones con la disposición opuesta a la que se propuso originalmente en el Esquema 5.1.

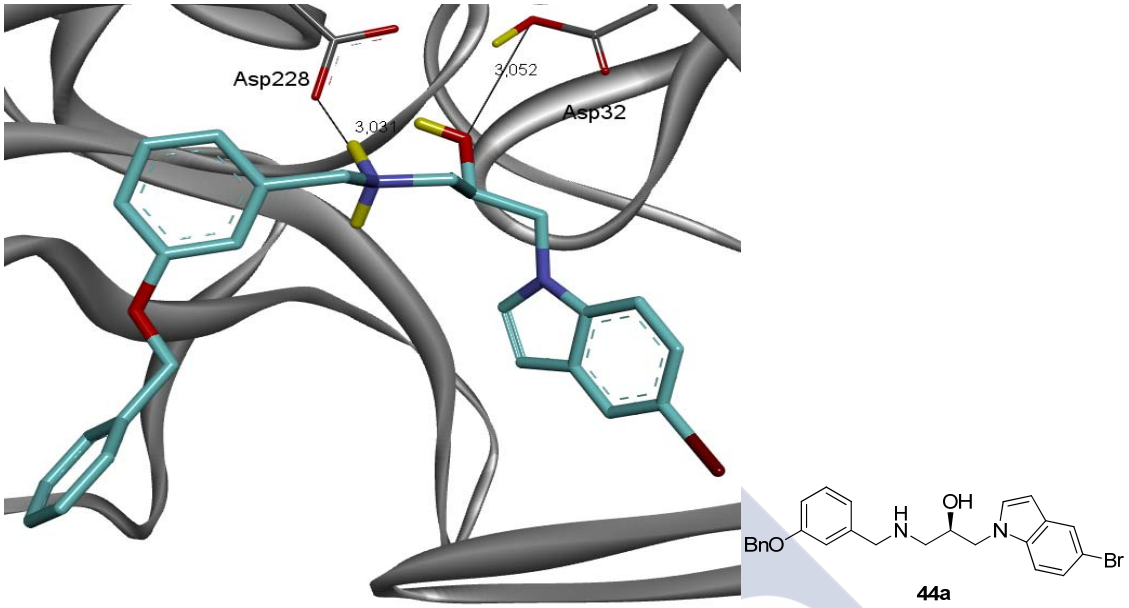
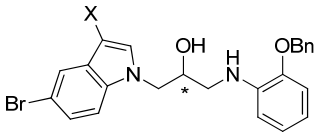


Fig 5.26.- Resultado de acoplamiento de **44a** en el sitio activo de BACE-1. Resultado obtenido mediante *ChemScore*, *flap* de apertura media.

5.5.2.- Resultados de Acoplamiento en Acetilcolinesterasa.

Las Tablas 5.14 y 5.15 listan los *hits* de las simulaciones de acoplamiento con AChE para los derivados que contienen un grupo anilina; así mismo, las Tablas 5.16 y 5.17 muestran estos resultados para los que contienen un grupo bencialmina, resumidos de manera gráfica en las figuras correspondientes (Figuras 5.27 y 5.28 para las anilinas, Figuras 5.29 y 5.30 para las bencilaminas). Un primer análisis de los resultados de salida muestra que la sustitución *meta* en la anilina/bencilamina incrementa el número de *hits* en comparación con la sustitución en *orto*. Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, el número de *hits* y el consenso alcanzado a través de las tres funciones de evaluación indican que los derivados de indol con bencilaminas se acoplan bien a AChE, ocupando tanto el sitio aniónico catalítico (CAS) como el sitio aniónico periférico (PAS). Además, cuando se comparan estos derivados de bencilamina con sus análogos de anilina, se observa que los primeros presentan un mayor número de *hits* en el conjunto de todas las técnicas de evaluación, posiblemente debido a que el incremento de la longitud de la cadena en un carbono permite a los ligandos alcanzar mejor ambos sitios de manera simultánea.

Tabla 5.14.- Resultados de acoplamiento en AChE de derivados de indol con anilina sustituida en *orto*.

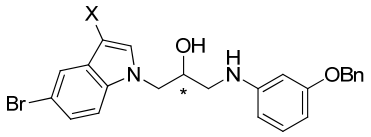


41a: X = H
41b: X = Br
41c: X = Me

Candidato			Posición Indol	Función de Evaluación*		
				ChemScore	***GoldScore***	***ChemPLP***
41a	R	Neut	CAS	56.98 (01/4)	79.59 (05/1)	115.7 (01/2)
	S	Neut	CAS	54.59 (02/3)	--	118.00 (01/2)
	R	Prot	CAS	54.04 (01/2)	--	123.87 (01/4)
	S	Prot	CAS	50.15 (10/1)	--	--
	R	Neut	PAS	--	--	108.89 (03/4)
	S	Neut	PAS	--	86.33 (07/1)	106.64 (05/2)
	R	Prot	PAS	50.65 (06/1)	--	111.52 (03/1)
	S	Prot	PAS	--	--	108.69 (01/1)
41b	R	Neut	CAS	55.36 (04/3)	91.21 (02/3)	126.83 (01/2)
	S	Neut	CAS	58.88 (01/3)	98.34 (01/2)	112.54 (03/3)
	R	Prot	CAS	55.04 (01/1)	86.35 (02/1)	114.03 (03/1)
	S	Prot	CAS	57.39 (01/1)	86.15 (08/1)	117.38 (01/2)
	R	Neut	PAS	--	--	--
	S	Neut	PAS	--	86.22 (08/1)	111.93 (06/2)
	R	Prot	PAS	53.00 (04/1)	--	108.89 (05/1)
	S	Prot	PAS	--	--	112.87 (03/3)
41c	R	Neut	CAS	56.44 (02/2)	93.47 (01/2)	121.63 (02/4)
	S	Neut	CAS	57.55 (01/4)	91.14 (02/4)	120.74 (01/2)
	R	Prot	CAS	56.93 (01/4)	--	127.32 (01/3)
	S	Prot	CAS	53.51 (04/2)	92.62 (05/1)	--
	R	Neut	PAS	--	--	108.38 (06/1)
	S	Neut	PAS	--	--	--
	R	Prot	PAS	--	--	111.00 (06/3)
	S	Prot	PAS	--	88.27 (06/1)	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras, para los dos enantiómeros y los dos estados de protonación del ligando.

Tabla 5.15.- Resultados de acoplamiento en AChE de derivados de indol con anilina sustituida en *meta*.



42a: X = H
42b: X = Br
42c: X = Me

candidato			Posición Indol	Función de Evaluación*		
				ChemScore	***GoldScore***	***ChemPLP***
42a	R	Neut	CAS	53.54 (03/2)	81.02 (05/1)	124.69 (01/3)
	S	Neut	CAS	54.43 (03/2)	89.21 (01/4)	114.42 (01/3)
	R	Prot	CAS	54.05 (01/2)	81.98 (04/1)	119.18 (01/3)
	S	Prot	CAS	54.89 (01/4)	83.26 (04/1)	112.14 (01/2)
	R	Neut	PAS	--	87.25 (01/2)	105.47 (07/3)
	S	Neut	PAS	--	--	105.38 (07/1)
	R	Prot	PAS	--	80.30 (05/1)	109.49 (05/2)
	S	Prot	PAS	--	82.74 (05/1)	109.77 (06/1)
42b	R	Neut	CAS	57.43 (01/5)	89.12 (03/3)	121.90 (01/4)
	S	Neut	CAS	55.07 (01/6)	92.62 (01/2)	120.73 (01/1)
	R	Prot	CAS	53.56 (01/3)	88.63 (02/2)	130.67 (01/2)
	S	Prot	CAS	54.26 (01/3)	85.55 (04/1)	120.84 (01/2)
	R	Neut	PAS	--	--	109.87 (08/1)
	S	Neut	PAS	--	--	--
	R	Prot	PAS	--	86.08 (06/1)	--
	S	Prot	PAS	49.87 (09/1)	--	112.83 (03/1)
42c	R	Neut	CAS	56.20 (01/4)	96.91 (01/3)	125.24 (01/3)
	S	Neut	CAS	57.06 (01/5)	95.00 (01/5)	119.24 (01/4)
	R	Prot	CAS	57.49 (01/3)	90.64 (01/2)	121.97 (01/6)
	S	Prot	CAS	55.37 (03/2)	89.54 (01/2)	119.87 (01/5)
	R	Neut	PAS	--	--	110.48 (09/1)
	S	Neut	PAS	--	--	--
	R	Prot	PAS	--	--	--
	S	Prot	PAS	--	--	--

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras, para los dos enantiómeros y los dos estados de protonación del ligando.

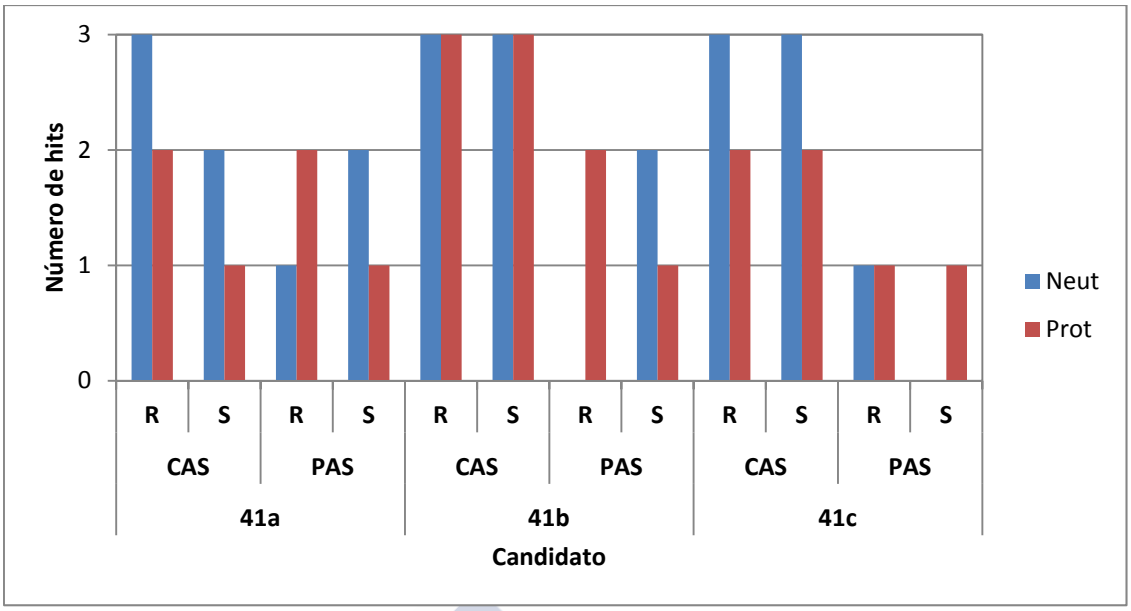


Figura 5.27.- Resultados de *hit* globales para AChE de los derivados de indol sustituidos con *orto*-anilinas.

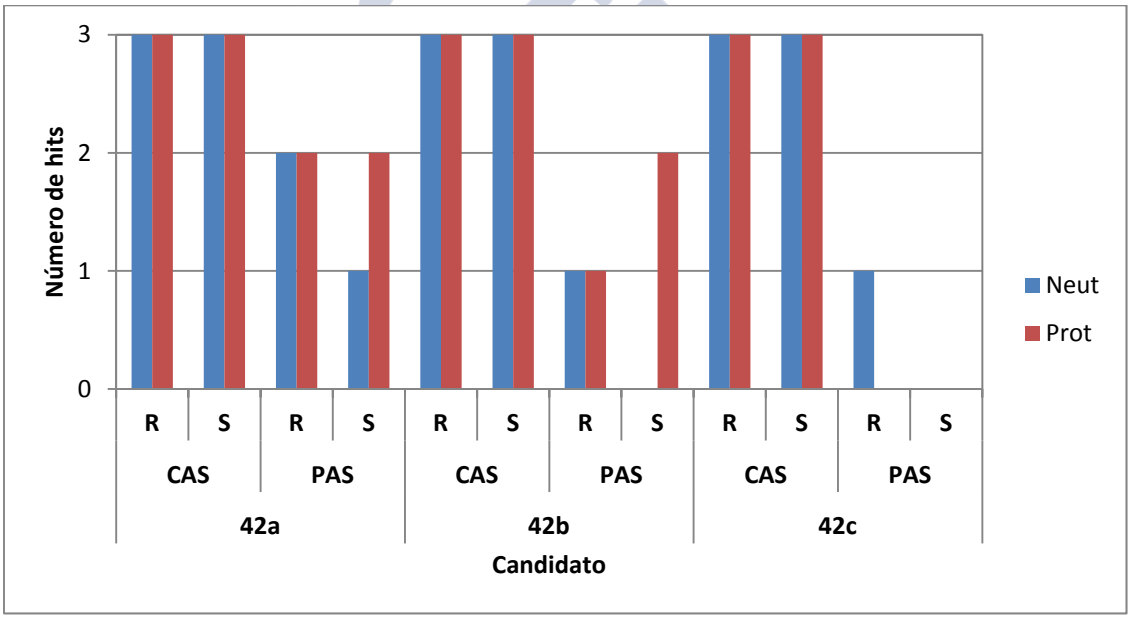
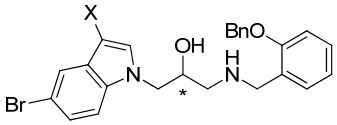


Figura 5.28.- Resultados de *hit* globales para AChE de los derivados de indol sustituidos con *meta*-anilinas.

Tabla 5.16.- Resultados de acoplamiento en AChE de derivados de indol con bencilamina sustituida en *orto*.

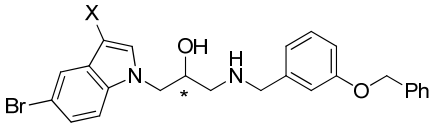


43a: X = H
43b: X = Br
43c: X = Me

Candidato			Posición Indol	Función de Evaluación[a]		
				ChemScore	*GoldScore*	*ChemPLP*
43a	R	Neut	CAS	55.20 (01/2)	--	115.82 (01/1)
	S	Neut	CAS	56.26 (02/2)	--	--
	R	Prot	CAS	58.68 (01/2)	90.28 (02/1)	114.56 (02/2)
	S	Prot	CAS	51.67 (06/2)	90.78 (02/1)	117.55 (01/2)
	R	Neut	PAS	--	83.10 (06/1)	107.82 (08/1)
	S	Neut	PAS	--	88.34 (01/1)	110.00 (01/2)
	R	Prot	PAS	--	--	114.18 (04/2)
	S	Prot	PAS	--	--	113.73 (02/3)
43b	R	Neut	CAS	57.85 (02/1)	91.32 (01/1)	112.80 (02/2)
	S	Neut	CAS	58.07 (01/2)	92.28 (02/2)	119.66 (02/1)
	R	Prot	CAS	59.77 (01/3)	91.86 (01/2)	117.70 (01/2)
	S	Prot	CAS	59.65 (01/2)	88.17 (04/1)	120.43 (01/1)
	R	Neut	PAS	55.57 (04/1)	--	--
	S	Neut	PAS	--	--	--
	R	Prot	PAS	--	--	108.98 (08/1)
	S	Prot	PAS	--	--	112.42 (04/1)
43c	R	Neut	CAS	58.70 (01/2)	91.84 (01/1)	121.09 (01/2)
	S	Neut	CAS	57.59 (02/2)	91.12 (01/1)	106.97 (06/1)
	R	Prot	CAS	60.81 (01/2)	95.79 (01/2)	128.48 (01/4)
	S	Prot	CAS	55.95 (01/2)	93.61 (01/1)	118.28 (01/2)
	R	Neut	PAS	--	--	107.68 (07/2)
	S	Neut	PAS	--	--	113.91 (01/3)
	R	Prot	PAS	--	--	111.23 (08/2)
	S	Prot	PAS	--	--	106.79 (08/2)

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras, para los dos enantiómeros y los dos estados de protonación del ligando.

Tabla 5.17.- Resultados de acoplamiento en AChE de derivados de indol con bencilamina sustituida en *meta*.



44a: X = H
44b: X = Br
44c: X = Me

Candidato			Posición Indol	Función de Evaluación[a]		
				ChemScore	***GoldScore***	***ChemPLP***
44a	R	Neut	CAS	60.21 (01/4)	93.08 (01/2)	110.34 (01/1)
	S	Neut	CAS	56.08 (01/2)	87.67 (03/3)	116.22 (01/1)
	R	Prot	CAS	55.59 (02/3)	93.37 (01/3)	122.36 (01/5)
	S	Prot	CAS	55.07 (01/3)	96.25 (01/1)	120.53 (01/3)
	R	Neut	PAS	--	82.42 (09/1)	107.68 (05/4)
	S	Neut	PAS	--	89.78 (02/2)	105.32 (05/3)
	R	Prot	PAS	--	--	114.14 (07/2)
	S	Prot	PAS	51.6 (04/2)	87.42 (04/1)	107.77 (07/1)
44b	R	Neut	CAS	57.07 (01/2)	95.48 (01/4)	121.82 (01/2)
	S	Neut	CAS	53.81 (03/4)	89.63 (04/2)	110.19 (01/2)
	R	Prot	CAS	57.13 (01/5)	102.63 (01/2)	119.51 (01/3)
	S	Prot	CAS	54.71 (03/3)	94.88 (01/1)	126.66 (01/3)
	R	Neut	PAS	52.87 (06/1)	--	109.22 (04/2)
	S	Neut	PAS	--	--	105.07 (03/3)
	R	Prot	PAS	--	86.88 (07/1)	109.33 (09/1)
	S	Prot	PAS	51.91 (06/1)	--	116.77 (03/2)
44c	R	Neut	CAS	60.6 (01/3)	98.12 (02/2)	116.88 (01/3)
	S	Neut	CAS	57.36 (01/3)	97.78 (01/2)	115.21 (02/1)
	R	Prot	CAS	57.23 (01/4)	97.05 (03/2)	124.81 (01/3)
	S	Prot	CAS	57.29 (01/3)	93.06 (01/2)	117.13 (01/3)
	R	Neut	PAS	--	81.41 (10/1)	110.91 (06/1)
	S	Neut	PAS	53.68 (07/1)	--	111.97 (03/2)
	R	Prot	PAS	54.38 (05/1)	--	--
	S	Prot	PAS	--	--	108.13 (06/1)

[a]Sólo se indican los valores de la salida de función de evaluación para aquellas estructuras que cumplen los requisitos de *hit*. Los números entre paréntesis indica la posición en el ranking de la pose para la que se obtuvo el resultado de *hit* más alto y el número total de poses que resultan en *hit* entre las 10 primeras, para los dos enantiómeros y los dos estados de protonación del ligando.

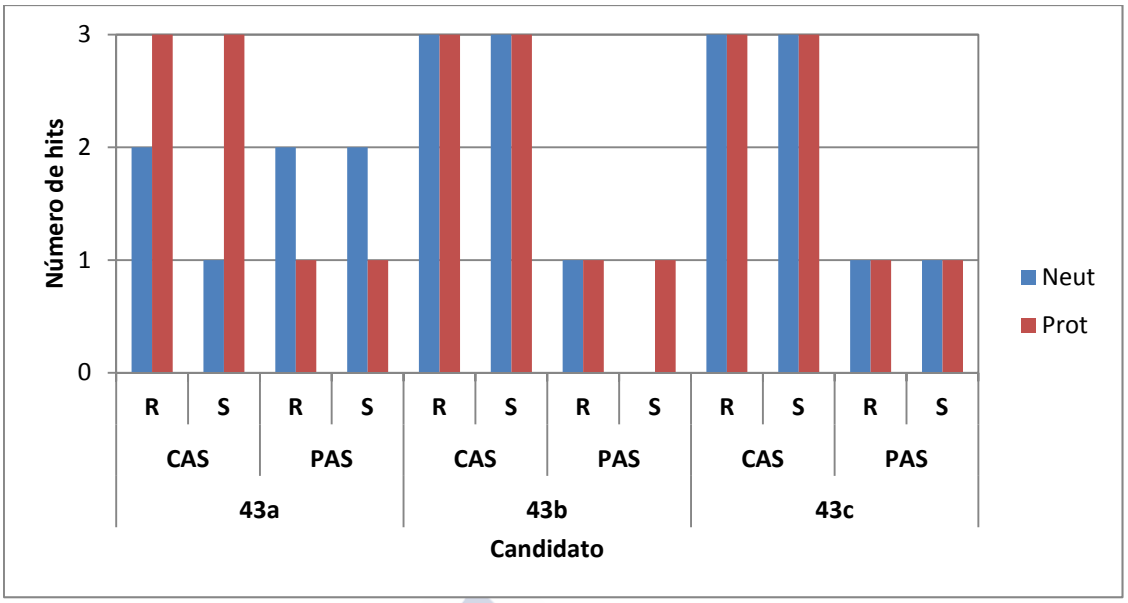


Figura 5.29.- Resultados de *hit* globales en AChE para los derivados de indol sustituidos con *orto*-bencilaminas.

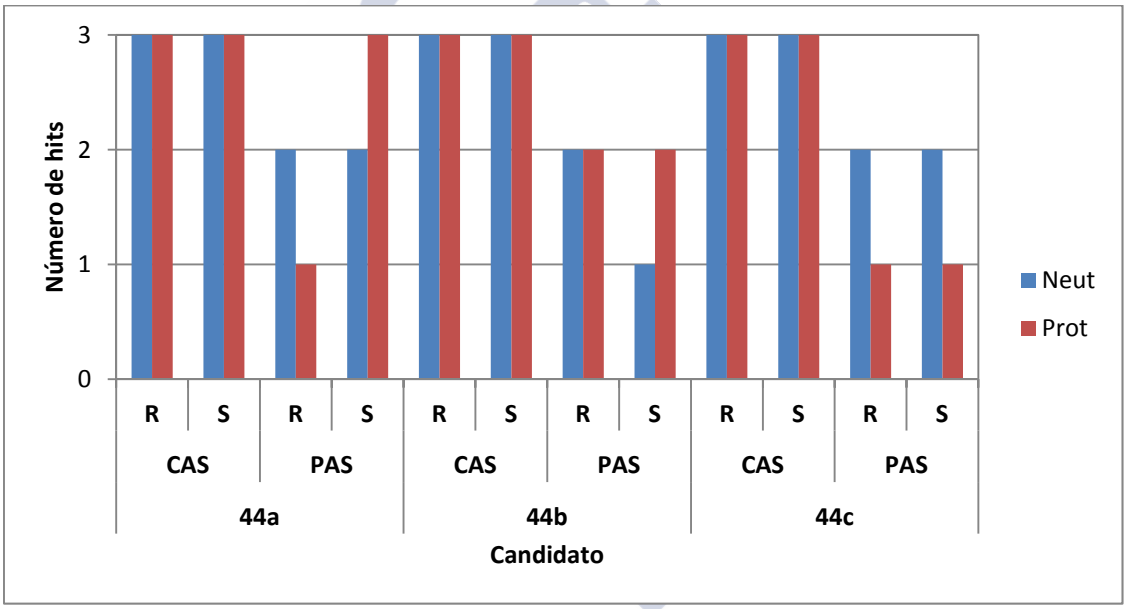


Figura 5.30.- Resultados de *hit* globales en AChE para los derivados de indol sustituidos con *meta*-bencilaminas.

Un aspecto interesante de los cálculos acoplamiento con AChE es la disposición de las de las poses de salida. Como hemos mencionado al hablar de las interacciones de nuestro farmacóforo con AChE, buscamos inhibidores duales capaces que ubicar uno de sus extremos aromáticos en el CAS y el otro extremo aromático en el PAS de manera simultánea, resultando ambos en interacciones de apilamiento π con los residuos aromáticos que se encuentran en ambos sitios, como se ha descrito en la Figura 5.2 en la introducción de este capítulo. Hay dos orientaciones de pose posibles que cumplen nuestros requisitos de *hit*. En la primera, el sustituyente indol se encuentra localizado en el CAS, mientras el sutituyente benciloxi de la bencilamina se encuentra en el PAS. La otra opción invierte estos contactos, con el grupo indol ubicado en el PAS y el benciloxi en el CAS. Estas poses se han etiquetado en las tablas y figuras

anteriores como "CAS" y "PAS", respectivamente, indicando la posición que ocupa el indol en el resultado de *hit*. Como muestran los resultados presentados, se observa un mayor número de *hits* de CAS tanto para anilinas como para bencilaminas, un resultado que intentaremos confirmar experimentalmente mediante cristalografía de rayos-X en el futuro.

Por último, los resultados presentados para los compuestos derivados de indol indican que no existe una preferencia clara por ninguno de los dos enantiómeros, así como tampoco existe una tendencia marcada a favorecer un estado de protonación neutro o cargado del candidato a inhibidor.

La Figura 5.31 muestra el resultado de evaluación más favorable del compuesto **44a** con la función de evaluación *ChemScore*, con el indol situado en el CAS. Se puede observar como el indol se coloca perfectamente para establecer las interacciones de apilamiento π con los residuos Trp84 y Phe330, mientras el grupo bencilo interacciona de manera similar con los residuos Tyr70 y Trp279. Además se pueden observar contactos de tipo enlace de hidrógeno del farmacóforo hidroxietilamina con el residuo Tyr121 del canal.

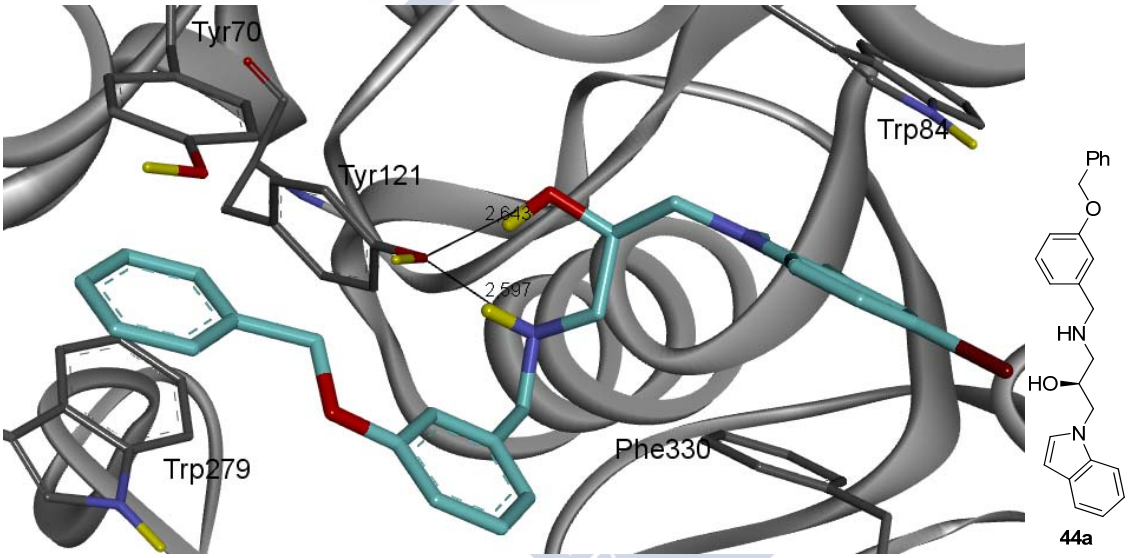


Fig 5.31.- Ilustración de **44a** en posición de π-stacking en el CAS (función indol) y PAS (función bencilo) de AChE. Posición obtenida con la función de evaluación *ChemScore*, ligando neutro.

5.5.3.- Resultados de simulación de inhibición de la agregación.

Hemos llevado a cabo las simulaciones de dinámica molecular de los fragmentos de péptido β-amiloide en presencia de dos de nuestros candidatos a inhibidor derivados de indol: **41b** y **44b**. Los resultados (recogidos en la Tabla 5.18) indican que el tiempo de residencia a una distancia máxima de 7.5 Å del péptido para estos compuestos es relativamente elevado (0.88 y 0.96 respectivamente).

Tabla 5.18.- Resultados de contacto del indol con Aβ12-28

Candidato	Fracción de contacto
41b	0.88
44b	0.96
Antraquinona	0.36

La Figura 5.32 muestra el tiempo de residencia del ligando en contacto con los residuos de Aβ12-28. Como se aprecia en la figura, los indoles tienden a residir cerca de los residuos

aromáticos del segmento LVFFA, particularmente de las fenilaminas en las posiciones 19 y 20 de la cadena péptidica. La otra región de alta densidad de contacto se encuentra en las histidinas 13 y 14. En ambos casos, los tiempos de residencia son marcadamente superiores a los del compuesto de referencia, la antraquinona.

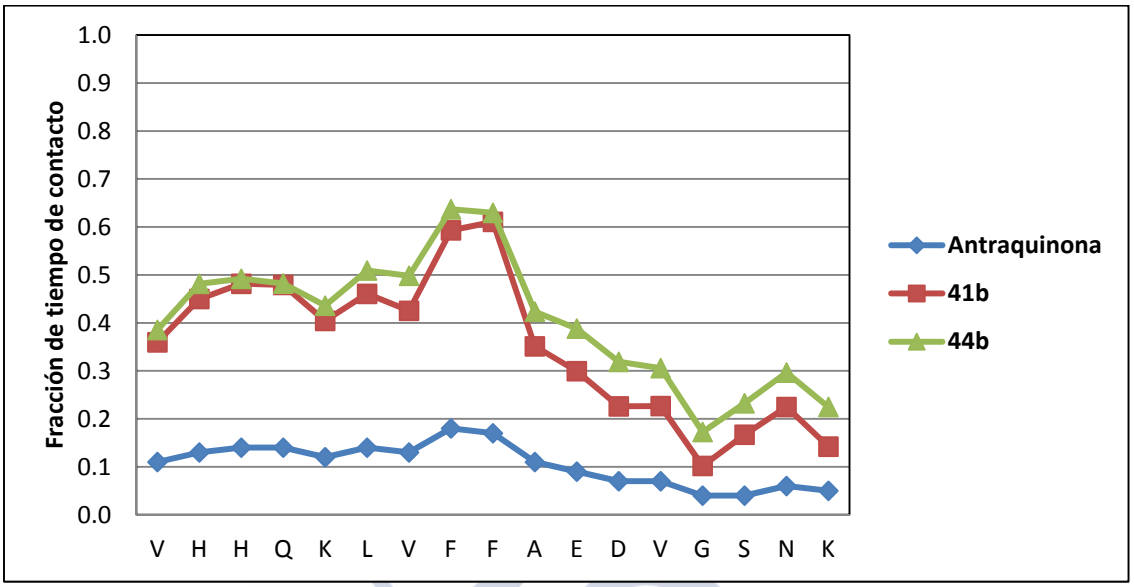


Figura 5.32.- Valores de tiempo de contacto de los residuos del péptido Aβ12-28 con los inhibidores de tipo indol **41b** y **44b**.

La Figura 5.33 muestra los resultados del tiempo de contacto entre residuos del péptido Aβ12-28 en presencia de los candidatos a inhibidor **41b** y **44b**. En dicha figura, se hace patente que los derivados de indol muestran una mayor capacidad para impedir la formación de una horquilla β que la antraquinona (ver Figura 5.8, página 111). Además, los resultados presentados en esta figura preveen que los compuesto que contienen un fragmento de bencilamina (como **44b**) podrían ser superiores a la hora de evitar la formación de agregados que los compuestos que contienen una anilina (**41b**), dado que inhiben mejor la formación de la horquilla β que permite la oligomerización de los péptidos.

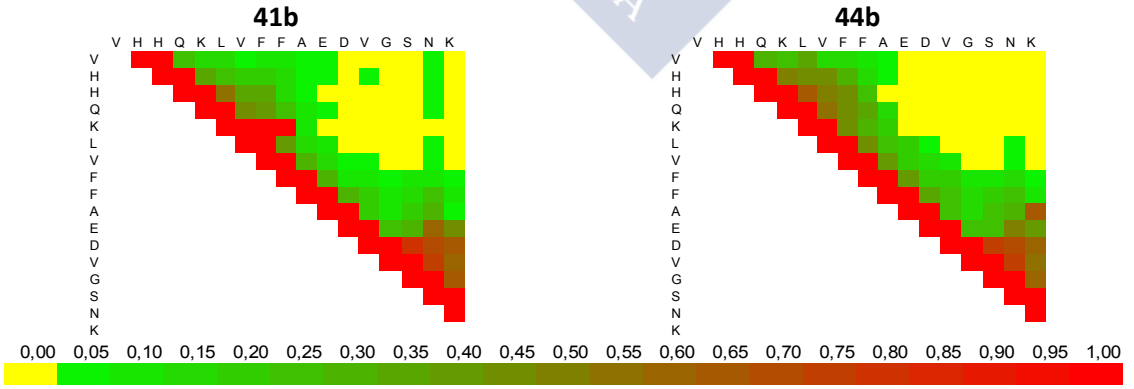


Figura 5.33.- Mapa de contactos de los residuos del péptido Aβ12-28 con el derivado de indol presente en el medio, según la escala de tiempos por color. No se muestra la diagonal.

La Figura 5.34 corresponde a un fotograma de la trayectoria de DM. En ella se ilustra el apilamiento π típico entre la cadena lateral de uno de los residuos fenilalanina (Phe20) y uno de nuestros derivados de indol.

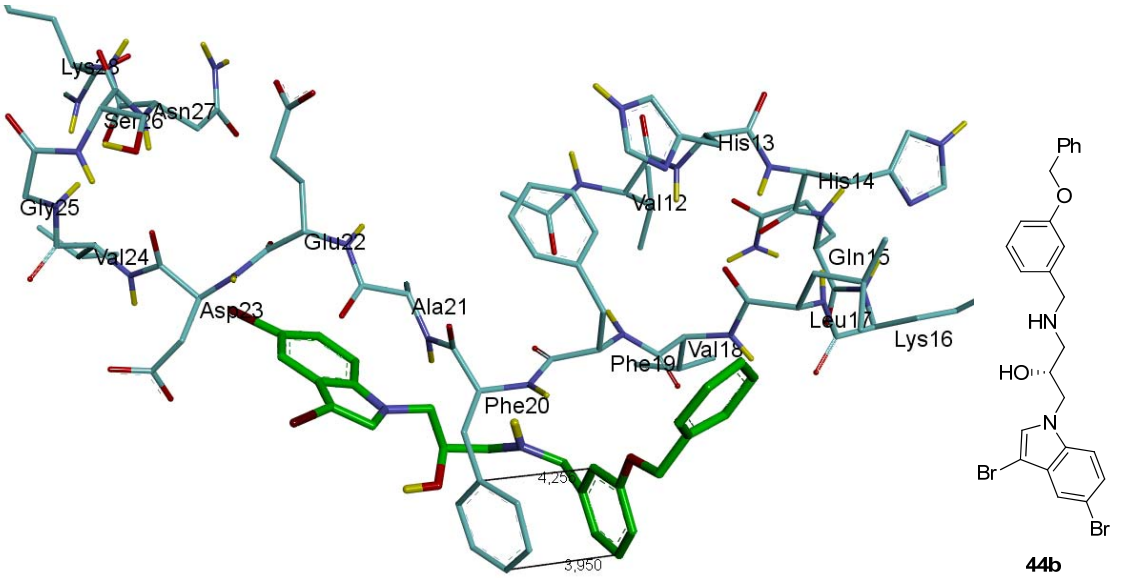
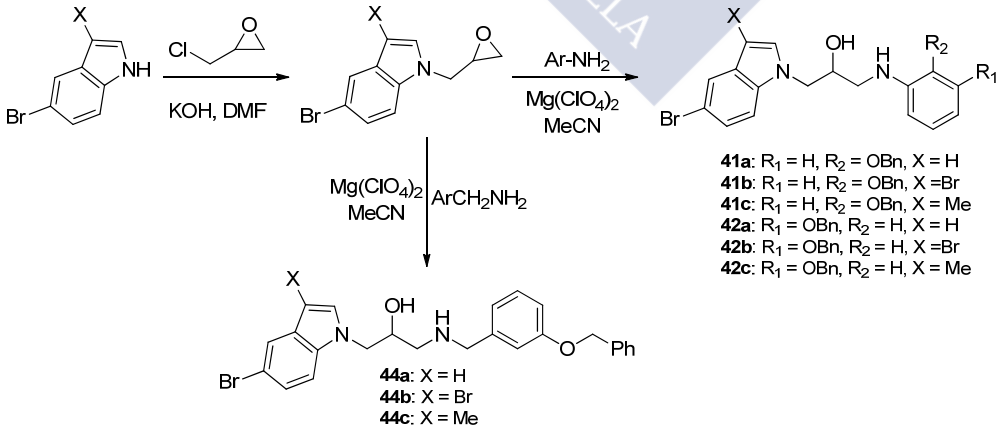


Figura 5.34.- Imagen extraída de una trayectoria de simulación de dinámica molecular del péptido Aβ12-28 (celeste) en un entorno con el candidato **44b** (verde).

5.5.4.- Sintesis de Indoles.

Para la síntesis de los derivados de indol empleamos un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de derivados de carbazol, tal y como se indica en el Esquema 5.4. De los compuestos presentados en este capítulo, se han sintetizado los derivados de indol con anilinas sustituidas tanto en *orto* (**41a, 41b, 41c**) como en *meta* (**42a, 42b, 42c**), así como con *meta*-bencilaminas (**44a**, **44b, 44c**). Las estructuras de los compuestos sintetizados se indican en el esquema.



Esquema 5.4.- Esquema general de la síntesis de derivados de indoles.

5.5.5.- Resultados experimentales.

Los resultados de las evaluaciones experimentales de inhibición de BACE-1, de AChE, y de la agregación por parte de los derivados de indol sintetizados se resumen en la Tabla 5.19. Como se aprecia en la misma, los compuestos con bencilamina sustituida en *meta* presentan una actividad mucho mayor que las anilinas sustituidas en *orto* para dianas como AChE, lo que valida los resultados predichos por nuestros protocolos de simulación. Más aún, el grupo indol combinado con una bencilamina sustituida en *meta* nos ha llevado a candidatos capaces de inhibir las tres dianas escogidas de la cascada amiloide (BACE-1, agregación de péptidos amiloides, y el PAS de AChE), así como al CAS de AChE y a BuChE, lo que implica un efecto colinérgico positivo adicional, por lo que compuestos como **44c** son candidatos ideales a inhibidores multidiana.

Tabla 5.19.- Resultados experimentales de los derivados de indol.

Candidato	EeAChE		HsBuChE		AB(1-40)		BACE-1	
	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 100 μM	IC_{50}(μM)	%inh@ 100μM	IC_{50}(μM)
41a	44 ± 1	--	17 ± 3	--	43 ± 1	--	5.7 ± 1.6	--
41b	45 ± 2	--	18 ± 3	--	23 ± 2	--	6.3 ± 1.4	--
41c	44 ± 1	--	19 ± 1	--	43 ± 5	--	16.4 ± 0.1	--
42a	--	8.5 ± 0.7	20 ± 2	--	55 ± 3	--	3.5 ± 2.4	--
42b	--	12 ± 1	17 ± 1	--	57 ± 2	--	1.8 ± 0.6	--
42c	--	9.3 ± 0.6	24 ± 1	--	22 ± 2	--	0.1 ± 0.1	--
44a	--	10.4 ± 0.1	--	0.70 ± 0.02	57 ± 3	--	--	3.0 ± 1.4
44b	--	9.1 ± 1.1	--	0.29 ± 0.05	47 ± 2	--	--	2.5 ± 0.1
44c	--	5.9 ± 1.0	--	0.39 ± 0.03	78 ± 1	34 ± 2	--	4.3 ± 0.8

Por último, estos resultados también nos aportan información estructural de suma importancia. Por ejemplo, los compuestos **44a**, **44b** y **44c** presentan mejor valor de IC_{50} para BuChE que para AChE. Las implicaciones estructurales de este resultado apuntan a que son capaces de difundir hasta el CAS de AChE e inhibir esa región, ya que ambas enzimas presentan una elevada homología en la estructura de su CAS, pero BuChE reemplaza los residuos aromáticos del PAS de AChE por residuos no aromáticos, lo que previene la formación de enlaces por apilamiento π en esa región, como habíamos descrito en la introducción de esta tesis (Página 19). Este resultado experimental apoya la conclusión de que nuestro diseño resulta en inhibidores de AChE duales que enlazan tanto al PAS como al CAS, una conclusión a la que ya habíamos llegado en el análisis de las poses resultantes de nuestros cálculos de acoplamiento (Figura 5.31).

5.6.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Como habíamos discutido en la introducción de la tesis, la búsqueda de compuestos cabeza de serie para las dianas de la cascada amiloide presenta un reto sustancial, dadas las marcadas diferencias entre los diversos sitios de enlace de las diferentes dianas. Hemos propuesto en este capítulo una ruta de diseño asistida computacionalmente que toma como punto de partida un farmacóforo diseñado con la información obtenida por nosotros y otros autores. La búsqueda de compuestos con el farmacóforo propuesto nos ha llevado a estudiar la idoneidad como inhibidores multidiana de la EA de tres familias de compuestos por medio de protocolos

de cálculos de simulación molecular. Los compuestos originales y algunas variantes más prometedoras obtenidas por varios ciclos de diseño han sido sintetizados y ensayados experimentalmente. Para llevar a cabo los estudios computacionales diseñamos un protocolo que combina simulaciones de acoplamiento para las dianas enzimáticas con simulaciones de dinámica molecular que estudiaron la evolución con el tiempo de un fragmento de péptido amiloide en la presencia de nuestros candidatos. De acuerdo con nuestro farmacóforo, definimos una serie de condiciones para las interacciones entre inhibidor y proteína que deberían verse cumplidas por las poses de salida obtenidas de las funciones de evaluación.

La primera familia de compuestos estudiados se compone de derivados de la 8-aminometil-7-hidroxicumarina. Aunque las cumarinas han recibido mucha atención anteriormente como posibles inhibidores de AChE y BuChE,[19] hasta donde alcanza nuestro conocimiento los derivados que hemos estudiado aquí no habían sido investigados anteriormente en este campo.

Nuestros resultados indican que no existe un consenso entre las funciones de evaluación que marque a estos compuestos como inhibidores de BACE-1 (Tabla 5.1). De la misma manera, su efectividad para prevenir la formación de la horquilla β del péptido amiloide en las simulaciones de dinámica molecular es casi nula, lo que indicaría que estas cumarinas no son buenos inhibidores de la agregación (apartado 5.3.3). Por contra, los resultados de acoplamiento en AChE (Tabla 5.2) se mostraban más prometedores, ya que si bien el tamaño de los compuestos no es el adecuado para alcanzar ambos bolsillos aromáticos de la enzima (CAS y PAS) de manera simultánea y establecer así apilamiento π en ambos sitios a la vez, sí se ha observado que las cumarinas son capaces de formar interacciones de apilamiento π con cada uno de los sitios por separado. Los resultados experimentales obtenidos (Tabla 5.4) respaldan los resultados de nuestras predicciones computacionales, ya que podemos observar que las cumarinas seleccionadas para la síntesis inhiben AChE satisfactoriamente, mientras que su capacidad de inhibición para BACE-1 y para la formación de fibrillas es muy baja. Por otra parte, nuestros resultados indican que estos compeustos no inhiben BuChE, lo cual indicaría que estos ligandos se ubican en el PAS de AChE y por tanto pueden presentar beneficios como inhibidores, tanto de la agregación amiloide como a nivel colinérgico. Los valores de IC_{50} obtenidos en AChE están en línea con los obtenidos para otras variantes de cumarinas.[19]

La segunda familia de compuestos estudiada se compone de derivados de carbazol análogos al dimebon, capaces de ejercer funciones neuroprotectoras y neurogeneradoras en ratones.[153] Los primeros compuestos estudiados, los derivados de carbazol con sustituyente anilina, presentaron un número reducido de *hits* en BACE-1 (Tabla 5.5), pero una cantidad razonable de *hits* para AChE. Nuestros ensayos experimentales (Tabla 5.11) corroboraron estos resultados, dado que los compuestos derivados de carbazol con anilinas no pasaron del 5% de inhibición de BACE-1 a 100μM). Además, los compuestos para los que preveímos un mejor resultado en nuestros estudios de evaluación (**31e** y **31f**, Tabla 5.8) presentan actividad inhibitoria a nivel micromolar para AChE. Al examinar la posición que ocupan estos compuestos en las poses de salida de los estudios de evaluación se observa que son capaces de establecer contactos de apilamiento π con ambos sitios de la enzima (CAS y PAS) a la vez, un resultado que podría explicar su mejor afinidad en comparación con sus congéneres.

Finalmente, algunos de los compuestos de este set muestran una capacidad para inhibir fibrillas ligeramente superior a la 9-10 antraquinona de referencia.[38]

En un esfuerzo para mejorar estos resultados, en particular los de BACE-1, modificamos la estructura de estos compuestos con la información obtenida en nuestros ciclos de diseño asistidos por ordenador. Los primeros resultados de las evaluaciones mostraban como la mayoría de los resultados de *hit* provenían de las simulaciones con la anilina protonada (ver Tabla 5.5), con lo que decidimos reemplazar la función anilina por un grupo bencilamina, lo que eleva el pK_a del grupo amino y por tanto aumenta la probablidad de que éste se encuentre protonado. Los resultados de evaluación computacional estimaron un incremento de la efectividad de las bencilaminas para BACE-1 (Tabla 5.6). Efectivamente, los resultados experimentales obtenidos para los compuestos sintetizados (**34e** y **34f**) mostraron un incremento en su afinidad de enlace a BACE-1 de tres órdenes de magnitud, alcanzando niveles de inhibición micromolar (IC_{50} = 3.1 μM para **34e** y **34f**). Estos compuestos han mostrado además afinidad por BuChE (Tabla 5.11). En un cerebro sano, AChE hidroliza el 80% de la acetilcolina mientras que BuChE juega un papel secundario. Sin embargo, como hemos discutido en la introducción de la tesis al hablar de la terapia colinérgica, la disminución de la actividad de AChE resulta en un incremento de la actividad de BuChE como mecanismo compensatorio, por lo que ambos enzimas pueden ser dianas terapéuticas de la enfermedad de Alzheimer.[155] Por lo tanto, estos compuestos tendrían un efecto terapéutico no sólo como inhibidores de las dianas de la cascada amiloide, sino también a nivel colinérgico. Los resultados del número total de *hits* entre las 10 primeras poses para los compuestos derivados de carbazol, presentados en las Figuras 5.35 y 5.36 (ver sección 5.7, anexo 1), parecen respaldar en líneas generales los resultados observados.

Por último, basándonos en la información obtenida en los estudios de derivados de carbazol, diseñamos una tercera generación de compuestos basados en indoles, que comparten los motivos estructurales de los derivados de carbazoles pero presentan un menor tamaño, con lo que se reducen los problemas de colisión estérica observados entre la función carbazol y algunos de los residuos de BACE-1 y AChE (Figuras 5.22 y 5.23). Para evitar este tipo de colisiones, diseñamos una nueva familia de compuestos donde la función carbazol fue reemplazada por un indol, un fragmento más pequeño. A efectos comparativos, decidimos conservar la variedad anilina/bencilamina en estos nuevos compuestos. Incluso en el caso de las anilinas, se puede observar como el reemplazo de un carbazol por un indol incrementa de manera sustancial el número de *hits* obtenidos para BACE-1, particularmente con un ligando neutro (Tablas 5.5 y 5.12). Además, como en el caso de los carbazoles, el cambio de una anilina por una bencilamina incrementa de manera sustancial la cantidad de *hits* obtenidos, particularmente cuando ésta se halla sustituida en posición *meta* en lugar de *orto* (Tabla 5.13). Nuestros resultados de acoplamiento para AChE muestran una preferencia por los inhibidores similar a la de BACE-1, con lo que podemos decir que se ha alcanzado consenso entre ambas enzimas en el diseño de un inhibidor. De nuevo, esta información se ve reflejada en los resultados del número total de *hits* entre las 10 primeras poses para los compuestos derivados de indol presentados en las Figuras 5.37 y 5.38 (ver sección 5.7, anexo 1), respaldando las conclusiones presentadas.

155. S.-Y. Li, N. Jiang, S.-S, Xie, K.D.G. Wang, X.-B-. Wang, L.-Y. Kong. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 801-814

Una cuestión relevante no sólo en el caso de la EA sino también en otras patologías asociadas a plegamiento de péptidos (como la diabetes tipo 2 o la enfermedad de Parkinson) es la existencia de un núcleo amiloidogénico, que sirve como plantilla para la formación de oligómeros amiloides y fibrillas. [156] Los resultados computacionales de las trayectorias de DM de una sección del péptido Aβ (residuos 12 a 28) en la presencia de nuestros candidatos de segunda y tercera generación (indoles y carbazoles) parecen indicar que los mejores inhibidores de agregación son capaces de modular la estructura secundaria del péptido, evitando en cierta medida la formación de la horquilla β que formaría el bucle central de la nucleación de los péptidos amiloides. Sin embargo, nuestro protocolo, al basarse en un único fragmento de péptido Aβ no sería capaz de dar una clasificación cuantitativa de inhibición, sino que sólo nos permite distinguir cualitativamente a los mejores ligandos.

Tomando los resultados de los cálculos y los resultados experimentales en conjunto, podemos concluir que los inhibidores derivados de indoles sustituidos con bencilaminas presentan, en general, una mejor capacidad de inhibición en el conjunto de las tres dianas terapéuticas elegidas para estudiar en este capítulo - la inhibición de BACE-1, la inhibición de AChE, y la inhibición de la agregación de fragmentos β-amiloides - en comparación con los derivados de carbazol y las cumarinas, lo que confirma los resultados de nuestro protocolo computacional dirigido a la búsqueda de candidatos a inhibidores de las dianas de la cascada amiloide subyacentes a la EA. Los indoles sustituidos con *meta*-bencilaminas presentan la capacidad de actuar como inhibidores multidiana para todas las dianas escogidas de la EA, lo que los convierte en candidatos aptos para posteriores estudios a nivel celular y animal.

Además de obtener predicciones robustas sobre la afinidad relativa de nuestros candidatos, nuestro protocolo asistido computacionalmente nos ha proveído de predicciones estructurales valiosas tales como el grado de apertura del *flap* del sitio activo de BACE-1 cuando se encuentra ligada a nuestros inhibidores, o la orientanción del ligando al enlazarse con AChE, cuya validez pretendemos verificar por cristalografía de rayos X.

156. L.E. Buchanan, E.B. Dunkelberger, H.Q. Tran, P.-N. Cheng, C.-C. Chiu, P.Cao, D.P. Raleigh, J.J. de Pablo, J.S. Nodwick, M.T. Zanni. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19285-19290

5.7.- ANEXO 1. GRÁFICAS DE *HITS* TOTALES ENTRE LOS DIEZ PRIMEROS RESULTADOS.

Las figuras presentadas en este apéndice recogen el total de *hits* obtenidos para cada candidato entre las diez primeras poses resultantes de las diversas funciones de evaluación. Esto es, la suma de todas las poses entre las diez primeras de la clasificación para cada una de las técnicas de evaluación (y en el caso de BACE-1, para cada grado de apertura) que cumplen las condiciones de *hit* definidas para la diana correspondiente. Como se puede observar, estas gráficas respaldan las conclusiones expuestas a lo largo del capítulo.

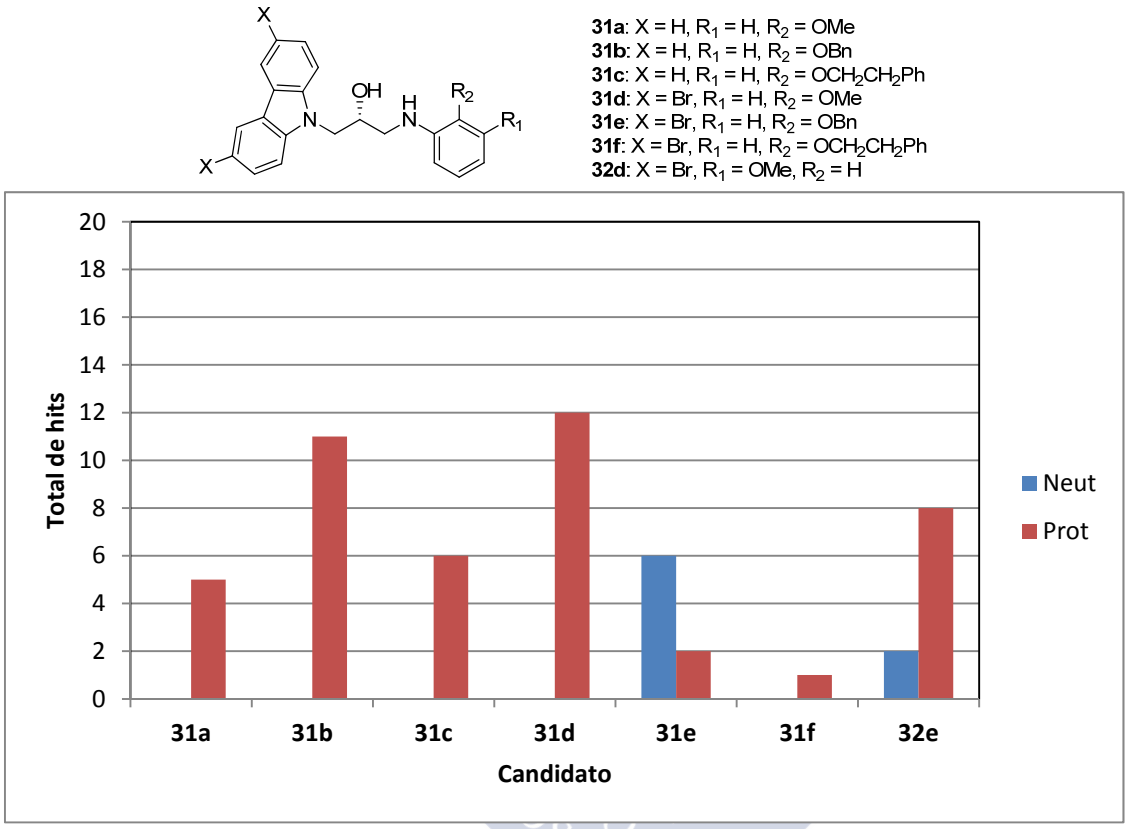


Figura 5.35.- Resultados de número total de *hits* entre las 10 primeras poses para BACE-1 de los derivados de carbazol.

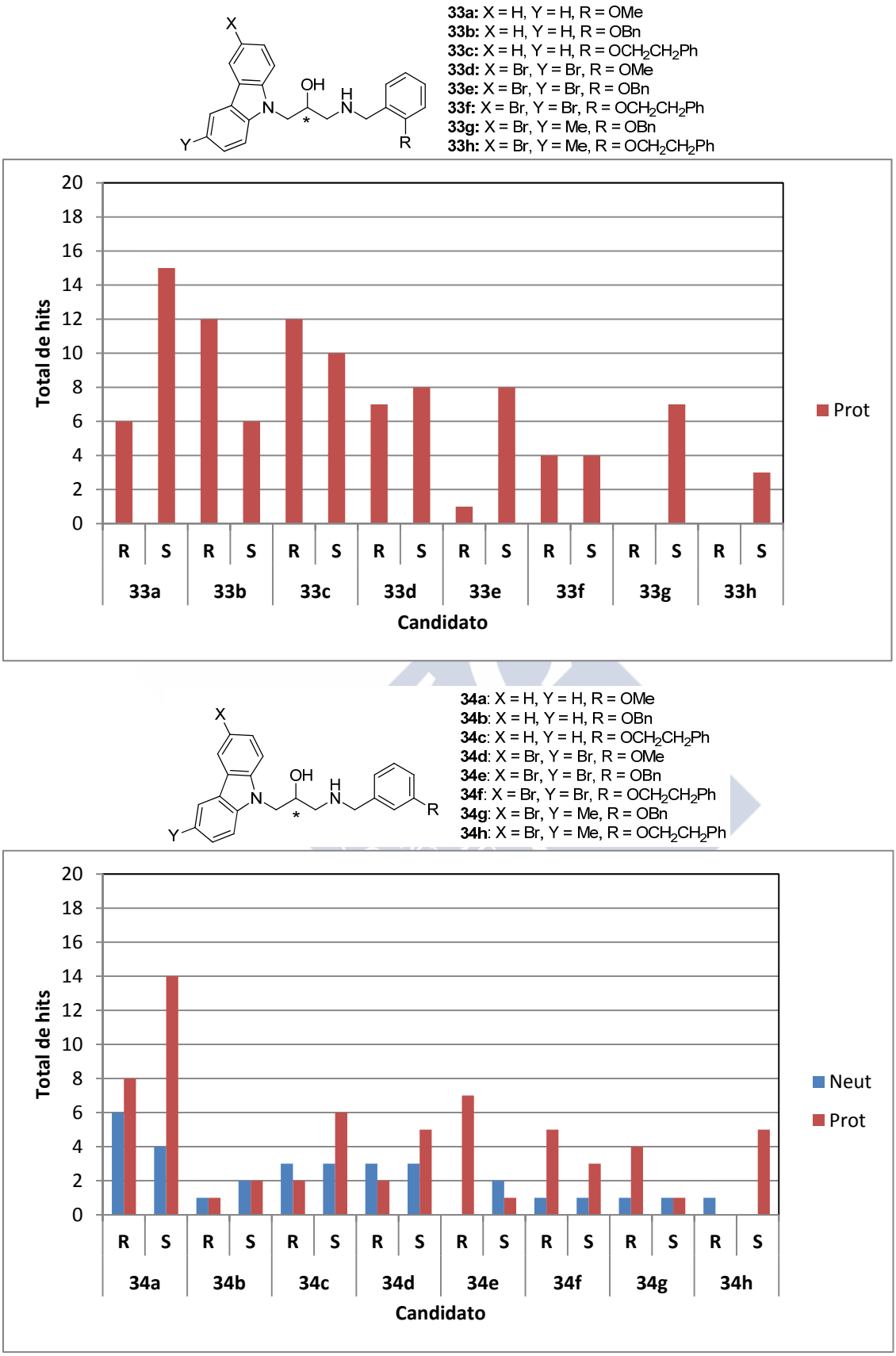


Figura 5.35. (cont)- Número total de *hits* entre las 10 primeras poses para BACE-1 de los derivados de carbazol.

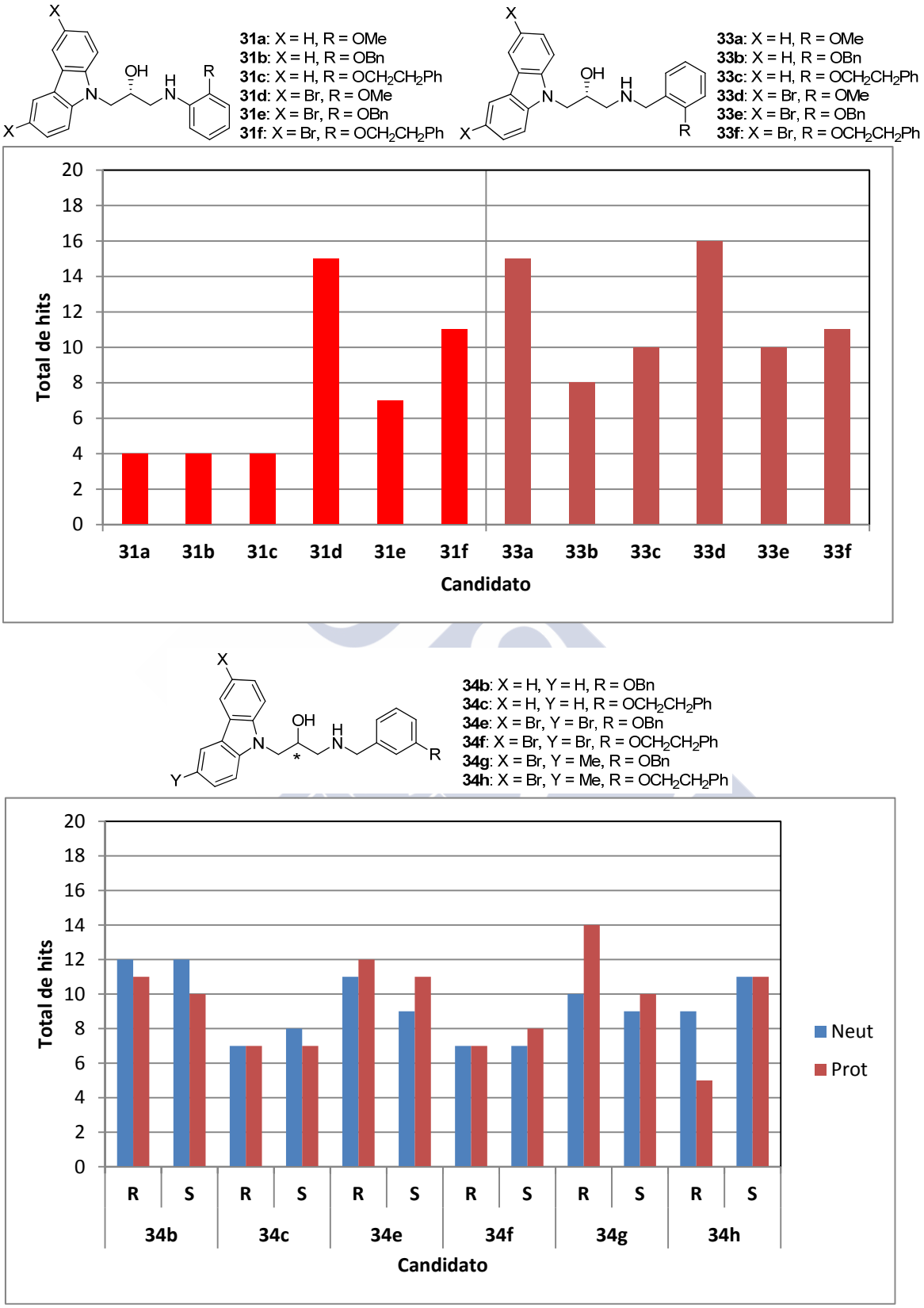


Figura 5.36.- Número total de *hits* entre las 10 primeras poses para AChE de los derivados de carbazol.

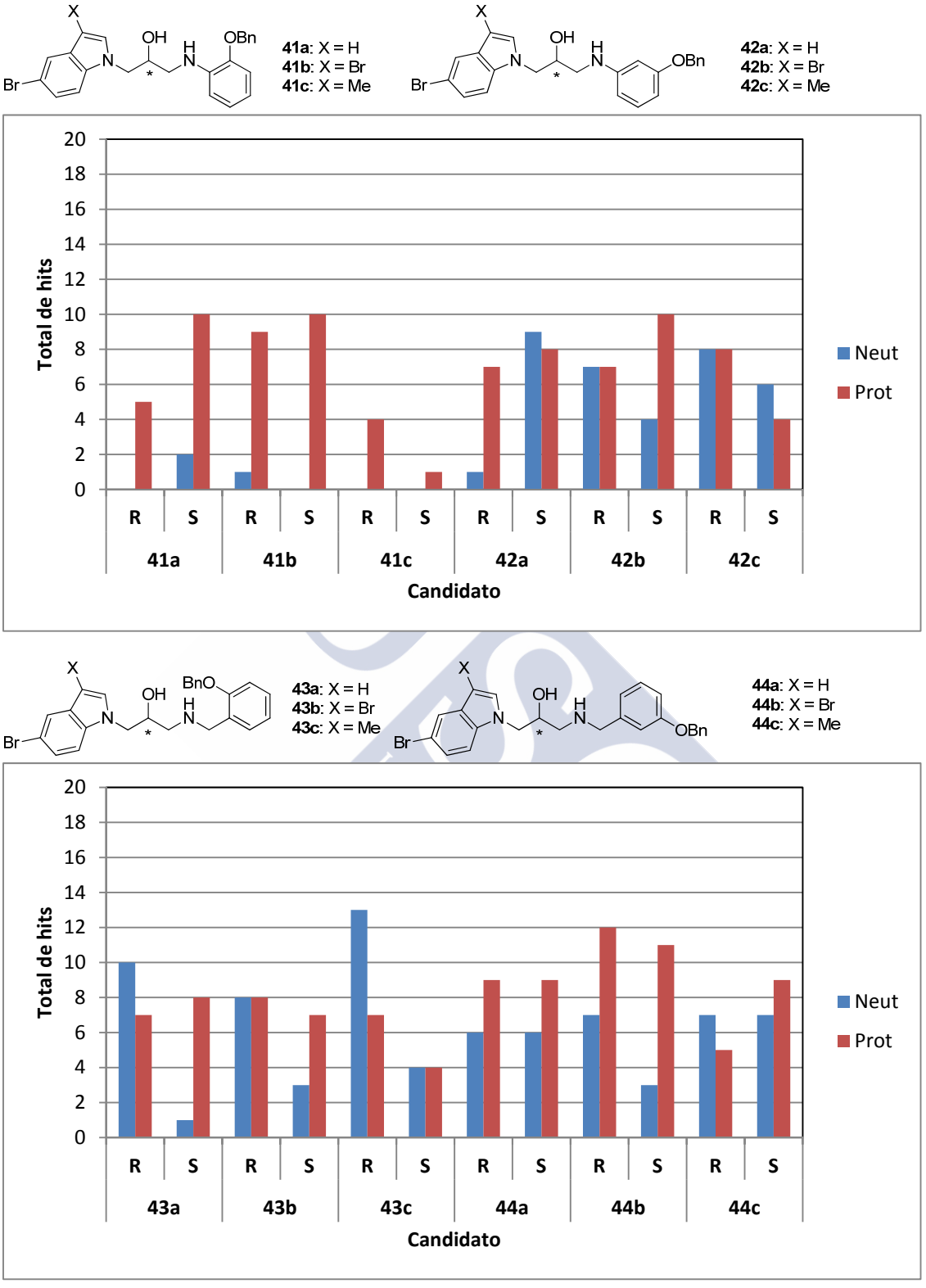
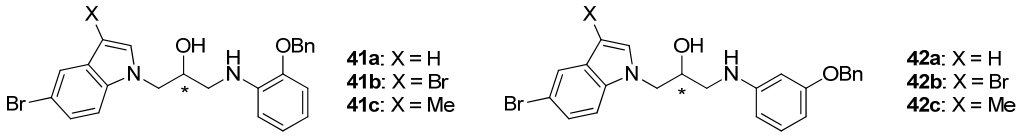


Figura 5.36.- Número total de *hits* entre las 10 primeras poses para BACE-1 de los derivados de indol.



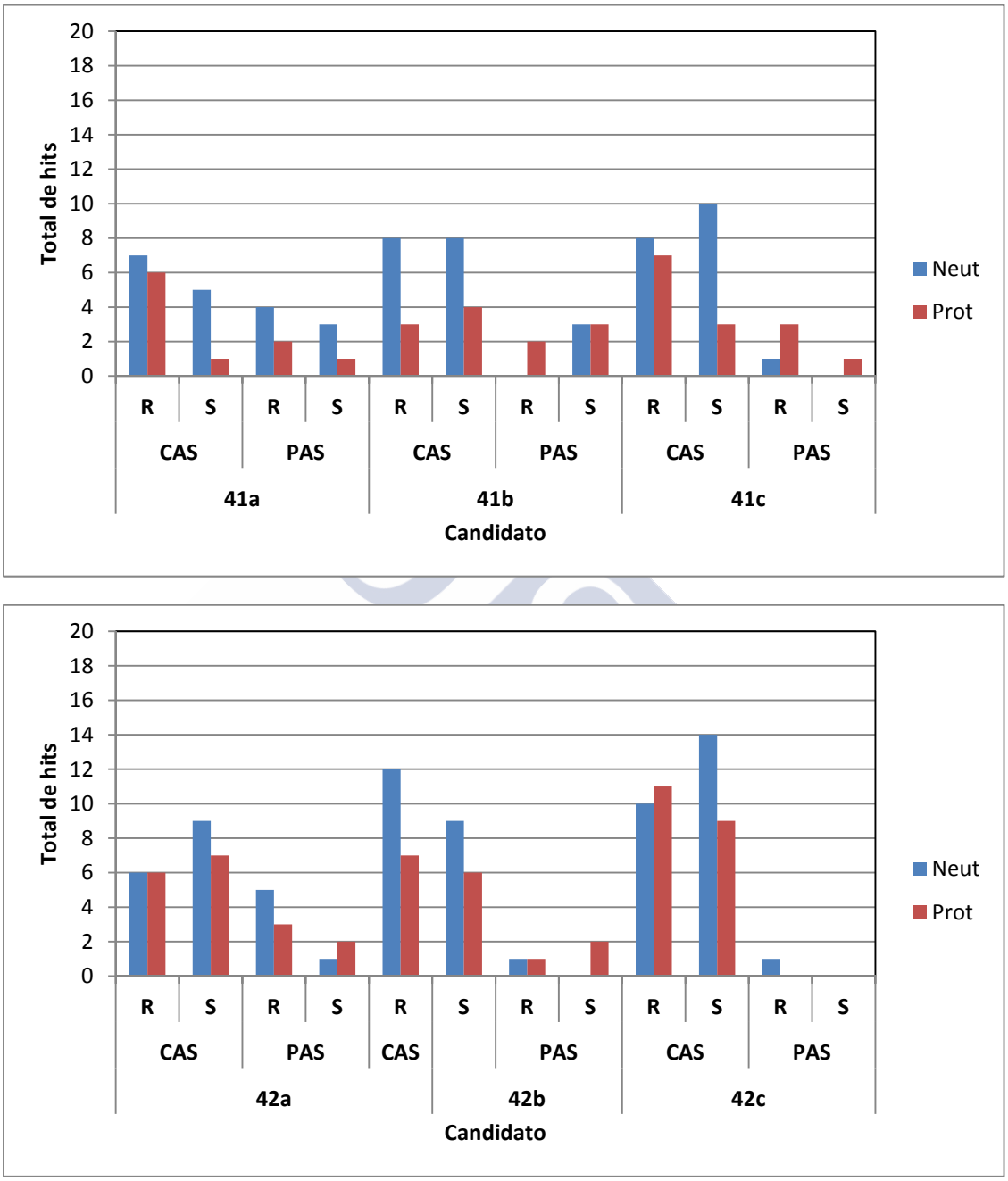


Figura 5.37.- Número total de *hits* entre las 10 primeras poses para AChE de los derivados de indol.

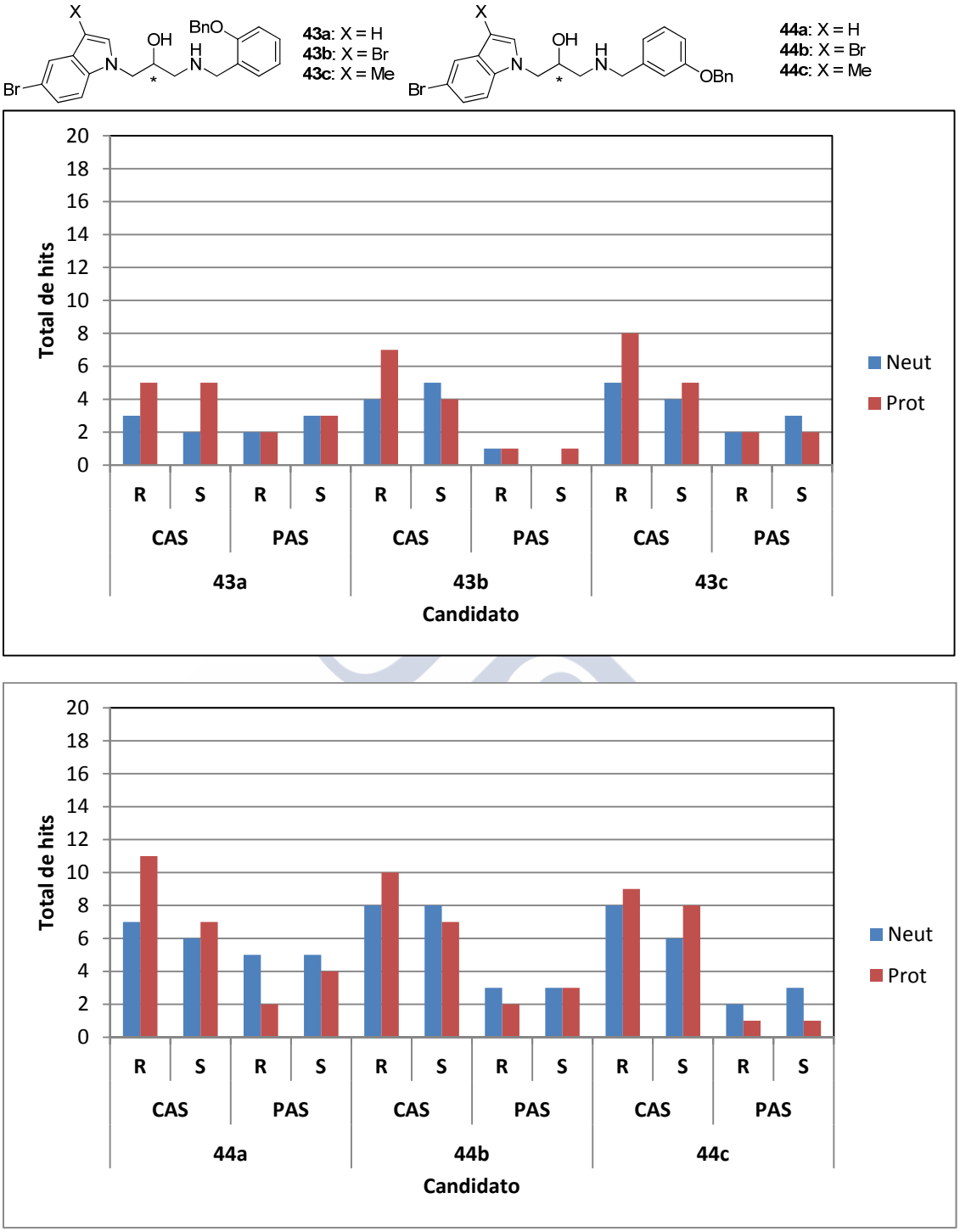


Figura 5.37. (cont)- Número total de *hits* entre las 10 primeras poses para AChE de los derivados de indol.

5.7.- ANEXO 2. FUNCIONAMIENTO DE AWK.

Para la primera parte de la búsqueda de hidroxiaminas en las bases de datos que utilizan códigos de tipo SMILES[142] se empleó el sistema buscador propio de cada base de datos, donde se describía la hidroxiamina en el buscador. Para evitar los falsos positivos de los buscadores (donde se tomaba una carbonilamina como hidroxiamina, debido a las similitudes de ambas estructuras en el código SMILES), uno de los miembros del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA), Aurelio Rodríguez, nos ha ayudado a crear un código sencillo de lenguaje AWK capaz de identificar, entre las cadenas de texto de las bases de compuestos descritos mediante SMILES, aquellos que poseían una unidad hidroxiamina. El código en función es como sigue:

```
#!/bin/bash
awk '{if(NR!=1){
smile=$1;gsub("=O","",smile)
if((index(smile,"O)")>0 && index(smile,"NH+")>0 || substr(smile,
length(smile), 1)=="O") && index(smile,"NH+")>0  ||
(substr(smile, length(smile), 1)=="O") && index(smile,"NH2+")>0
|| (index(smile,"O)")>0 && index(smile,"NH2+")>0))
print $0}}' $1
```

Como se puede observar, el código sustituye el identificador de SMILES de carbonilo ("=O") por un espacio en blanco, para a continuación buscar aquellas moléculas en la base de datos de Smiles que posean un grupo amina primario o secundario además de un hidroxilo. Después, las cadenas se restituyen (se deshace la sustitución del carbonilo por un espacio en blanco) antes de convertir los archivos de SMILES a un formato manejable por el software GOLD.



CHAPTER 6.

THESIS CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Hereafter we summarize the most important milestones achieved in this thesis and its implications for the field of Alzheimers' disease drug discovery.

6.1. BINDING AFFINITY pH DEPENDENCE IN ASPARTIC PROTEASES.

The first major objective of this thesis was to obtain insights into the effect of the chemical nature on the charge state of titratable residues in aspartic proteases. For this purpose we studied the effect of pH on the inhibitor affinity to BACE-1 and HIV-1, two enzymes of this family that are important therapeutic targets. The protocol used for carrying these studies involved SPR experiments for determining the inhibitor affinity at several pH values, which were then explained by a the use of molecular calculations aimed at elucidating the underlying causes of the pH effect on affinity.

6.1.A.) In the case of BACE-1, we chose six different BACE-1-inhibitor complexes with known structures whose affinities where studied at pH 4.5 (the optimal pH for the enzyme) and at pH 7.4 (close to the pH at which the crystal structures were obtained). In a first stage we calculated the pK_a values of all titratable residues of the protein by an approximate solution of the Poisson-Boltzmann equation. The results enabled us to determine the protonation states of these aminoacids at the above mentioned pH values. Perusal of the predicted aspartic dyad protonation states underscores the pK_a dependence on the inhibitor's chemical nature, an outcome that is at variance with previous studies carried out in other labs.

The aforementioned charge assignments allowed us to study the pH dependence of the ligand binding affinities for all complexes studied Our calculations indicate that hydroxyethylene (HE) isosteres induce a diprotonated state of the dyad at acidic pH and a monoprotonated state at neutral pH; a protonated amino isostere induces a monoprotonated state of the dyad at acidic pH and a fully ionized state at neutral pH; finally, hydroxyethylamine (HEA) isosteres induce a monoprotonated state of the dyad at both pH values. These calculations reproduce the entire observed affinity ranking upon pH increase and most of the binding trends among inhibitors at low pH values. The agreement between calculated and observed binding ratings lends support to the pK_a assignments provided by the protocol used during our studies.

The variability of the charge states elicited by our set of inhibitors suggest that it might not be advisable to perform in silico HTS search of fragments or BACE-1 putative ligands with one single protonation state across the board, as done previously by several research groups. More likely, the igands would have to be classified in accordance with the protonation state they can elicit from the Asp dyad, and then the HTS screening could proceed with several enzyme targets differing in their protonation states.

Finally, our calculations have implications for the design of cell active BACE-1 ligands. Our results indicate that those inhibitors that are active at acidic and neutral pH present good cell readouts, a result that have deep implications for the inhibitor’s isostere structure and which allowed us to built a pharmacophore for data base ligand screening.

6.1.B) For the examination of the effect of pH on the binding affinity to HIV-1 PR we selected six ligands, some of them known AIDS drugs like indinavir, nelfinavir and sequinavir. For this study we used a protocol based on a combination of SPR assays and molecular mechanical assays, similar to the one applied to BACE-1/inhibitor complexes.

Our calculations show that upon inhibitor binding, many ionogenic residues display noticeable shifts from their standard values in solution, a result that depends on the polarity of theprotein cavity where they find themselves. The highest pK_a increases are observed for the Asp dyad residues. The short hydrogen bond distances between the inhibitor's OH group and one of the carboxylate oxygens has led us to postulate the presence of Low barrier hydrogen bond between these two atoms, and found that their presence are of the essence in rationalizing the calculated pK_a values for the Asp dyad when bound to some inhibitors and the binding affinities of these ligands. For the most part, the binding energy differences observed by SPR experiments upon a pH change are rather small. Nonetheless, the calculated trends on binding affinity upon pH increase reproduce with few exceptions the ones observed in the SPR experiments.

6.2.- EFFECT OF THE LIGAND AND ENZYME CHARGE STATES ON FRAGMENT SELF-DOCKING PERFORMANCE TO BACE-1.

The second objective was the development of a docking protocol for fragment like ligands to BACE-1. Some of the successful approaches for lead BACE-1 targeted lead drug design have as a starting point the HTS of fragments. Since our earlier studies (see above) predicted a major role for the active site protonation state of this protein on the inhibitor binding ranking, we designed a docking algorithm that takes into account this feature explicitly and have applied it to a set of 23 ligands with a variety of chemical structure motifs that span four orders of magnitude in their binding affinities. As a first step in our protocol we calculated the protonation states of all enzymes' ionisable residues at neutral and acidic pH values prior to docking the ligands back into their BACE-1 binding site. We have found out that the calculated pK_a values of the BACE-1 acidic residues deviate substantially from the estimates for model compounds in solution and display a high dependence on the ligand chemical structure, especially in the case of the Asp dyad residues, a result that should be taken into account in docking based ligand screening campaigns. Our calculations on BACE-1 bound to fragments indicate that at pH 4.5, the Asp dyad monoprotonated charge state, with the proton on Asp 32, is the most prevalent state. However, our results also point out that other protonations are possible. Hence, an option aimed at enriching the docking results could be based on ensemble docking with a set of protein structures that contain our most commonly predicted Asp dyad protonation states and include the protonation state for the other acidic residues at pH 4.5.

The docking poses for docking were generated with the help of three scoring functions (*ChemScore*, *GoldScore* and Chemplp) available in the GOLD suite of programs. The resulting poses where re-evaluated with these scoring functions and a CHARMM scoring function. This protocol have enabled us to evaluate the possible protonation states of the ligand, and also for the first time in docking studies the effect of pH on the docking outcome.

Two of our main specific objectives were to find out the conditions under which the crystallographic poses could be reproduced, and it will be possible to rank accurately the ligands at the optimal pH of the enzyme. These studies enabled us to determine if the protonation state of the ligand and the ionisable residues of the enzyme had a bearing on the results. We found out that the biggest influence on the *hit* rate success is produced by the assignment of a charge state to the inhibitor and the choice of pH value. The enrichment provided by assigning a positive charge to the inhibitor probably is the result of a polar micro-environment created in part by the Asp dyad, which enables the ligand ionisable fragment to keep or increase its pK_a value predicted in solution. In one case (ligand 3H0BS) we have shown that our calculations have enabled us to predict an approximate pK_a figure for the ionisable fragment of the inhibitor, and in some other cases our protocol has allowed us to identify the most likely protonated N atom in charged inhibitors. The highest success rate for finding the observed pose was obtained at neutral pH. This outcome stands to reason since the crystallographic BACE-1/inhibitor complex structures are obtained at a pH close to 7. Preliminary results indicate that at the enzyme's optimal pH range (at which all binding assays are carried out) our protocol is able to cluster the experimentally observed best binders at the top of the ranking, and the worst binders at the bottom. It would be desirable to perform the screening campaigns at this range of pH, since the candidate ranking position probably changes with this medium acidity.

We found out that the docking performance results have a strong dependence on the evaluation function used in the re-scoring stage. Some of the best results are obtained a MM interaction energy scoring function within a CHARMM force-field. It is possible that the use of this kind of functions in pose generation may improve the binding ranking prediction in docking simulations, a very important and unmet aim in this area of research.

We have found a possible rationale for the poor docking performance of some ligands across the board regardless of the protocol used. The results imply that the least successful compounds have few anchoring interactions with active site residues compared to those with a high success rating, missing hydrogen bond contacts with one or both residues of the Asp dyad. This result could be used in future screening campaigns to weed out fragments that do not attain a minimum number of anchoring interactions and thus could produce false negative poses.

6.3.- SEARCH FOR MULTITARGET AD DRUGS LEADS.

The main and most extensive objective of this thesis is the search for single molecular entities that bind several amyloid cascade targets simultaneously. The major hurdle in the search for multitarget leads lay on the substantial structural an sequence specificity differences amongst the binding sites of the amyloid cascade targets, which hinders drastically this therapeutic strategy. To tackle this issue, we have proposed in this work a computer assisted route that relies on a pharmacophore whose scaffold was built on previous knowledge obtained in our lab and others. Preliminary screening of various data bases and literature lead us to several families of compounds. Some of these compounds contained hydroxyamines and some aromatic groups (like cumarines and carbazoles), features that fulfill the pharmacophore

scaffold, and hence could turn these leads into good candidates as inhibitor lead for AD targets like BACE-1, AChE, BuChE and amyloid aggregation.

To screen these compounds for BACE-1 we applied a docking protocol that took into account the binding site flexibility by pose search into BACE-1 templates with three flap conformations that differ in their opening. The selected poses had to fulfill the following conditions: they had to reproduce the hydrogen bond network described for our pharmacophore and be one of the top three ranking poses. In the case of AChE, the chosen poses had to associate with some of the aromatic residues that line up the catalytic anionic site and/or the peripheral binding site through π-stacking interactions, besides being the top choices of the scoring functions.

Since the amyloid peptides present a range of binding hot spots, we replaced the docking protocol used for the two enzymatic targets by lengthly molecular dynamics (MD) based calculations of a segment of the abeta peptide in the presence of the candidate ligand. Here the best candidates were measured by their ability to stay close to the peptide and inhibit the formation of a beta hairpin, the possible monomer template for peptide amyloid aggregation.

Some of the best candidates that resulted from the *in silico* screening were synthesized and assayed for binding to BACE-1, AChE, BuChE and amyloid aggregation. Below we present some of the conclusions of these studies.

Our initial search yielded a group of 8-(aminomethyl)-7-hydroxy-4-methyl-cumarin derivatives (henceforth referred to as "cumarines"), with varying substitution at the aminomethyl moiety. The computer aided design indicated that most of the 27 cumarines studied produced very few hits, with little consensus amongst the scoring functions for BACE-1. Our MD calculations indicated that the ligand residency time around the peptide was rather low and that only a couple of compounds inhibited the formation of a beta hairpin. Nevertheless, the docking to AChE indicated many hits with an ample consensus across most scoring functions. Seven of the top cumarine candidates were synthesized and assayed for binding to all our targets. The experimental results clearly indicate that these compounds are poor BACE-1 and Aβ aggregation inhibitors, but show micromolar affinities for AChE, in full accordance with the predictions. The BuChE assays seem to indicate that the synthesized cumarins bind to the peripheral site.

A bibliographical search for compounds with the proposed scaffold led us to a group of carbazole contaning compounds with substituted aniline fragments, which have been previously identified as neuro-protecting and neuro-generating compounds in mice. The research performed on these candidates had a twofold aim. Firstly, to investigate if these compounds owed their biological activity to their binding with some of the amyloid cascade targets, and secondly, to search for analogues with an increased affinity for the largest possible group of amyloid cascade targets. The first round of calculations to our original compounds displayed very few hits in BACE-1 but a number of hits in AChE. Our binding assays corroborated the outcome of our calculations, since the initial set of compounds displayed low affinities for BACE-1 (not surpassing the 33% BACE-1 inhibition at 1mM). Nevertheless, as predicted by our calculations, those compounds that present the largest scoring function values in our docking calculations (see results for **31e** and **31f**) presented μM affinity for AChE. Perusal of the exit docking poses indicates that these compounds are able to span both AChE

binding sites, a result that could explain their better affinity as comparted to their congeners. Finally, some of the compounds in the initial set display a fibril inhibition slightly above that of the reference compound 9-10 antraquinone.

In order to improve the binding across the amyloid targets and specially for BACE-1, we proceeded to modify these compounds with the information afforded by two computer aided design cycles. The initial screening results for BACE-1 anticipated that most of the hits were obtained with a protonated amino group in the aniline. In order to improve the probability that the amino group will actually be protonated, we replaced the aniline moiety with a benzylamine fragment. The docking results predicted that these second generation compounds would improve their *hit* rates, mainly for BACE-1. In order to test this outcome, we synthesized and assayed two of the benzylamine containing compounds that showed promising results (**34e** and **34f**). The binding assays indicated that the new candidates improved their binding affinity for BACE-1 by more that 3 orders of magnitude (IC_{50} = 3.1 μM). Interestingly enough, these compounds also showed affinity for BuChE. In healthy brains, AChE hydrolizes about 80% of the acetylcholine while BuChE plays a second role. However, as AD progresses, the activity of AChE is greatly reduced in specific brain sections while BuChE activity increases, likely as a compensation mechanism for the AChE depletion. Consequently, both enzymes are useful therapeutic targets for AD and our experimental results indicate that our compounds not only should affect the amyloid cascade at the core of the AD, but should have a positive cholinergic effect.

Also, as predicted by our *in silico* studies, these final carbazol containing compounds are better BACE-1 and Aβ aggregation inhibitors than the cumarine candidates identified in database screenings.

Perusal of the predicted poses when bound to BACE-1 and AChE indicated that there are some short van der Waals contacts between the carbazol moiety of the ligand and the protein. In order to avoid these putative steric clashes we designed a new generation of compounds replacing the carbazole moeity with an indole group with varying substitution at the amino function (forming substituted anilines and benzylamines).

As in the case of the carbazol derivatives, our BACE-1 docking calculations indicate that the benzylamine substitution enhances the affinity of the indols for this enzyme (over those bearing an aniline moiety).

The AChE docking results indicate that there is a substantial number of hits with a high degree of consensus across all scoring functions. The results indicate that the indole fragment could fit either at the PAS or the CAS, but there is a bigger consensus across the board for a CAS positioning. Analysis of the MD trajectories for a short amyloid peptide in the presence of the indole derivative candidates indicated that they are able to inhibit the nucleation step that precedes the amyloid aggregation.

Some of the indole derivatives were synthesized and evaluated by our collaborators, indicating that (as in the case of the carbazol derivatives) the benzylamine are more potent leads than their aniline counterparts. The results of these assays indicate that both the carbazol and indole containing compounds inhibit simultaneously several several amyloid cascade targets.

The most promising multitarget candidates (**44a, 44b and 44c**) are able to bind all targets, giving a proof of concept for the multitarget approach to AD, both at the amyloid cascade and cholinergic pathways. Finally, our results shed light on an open question that relates to the existence of the amyloidogenic core which serves as a template for amyloid oligomers and fybril formation, an issue that is relevant not only to AD but also to other pathologies, such as diabetes type 2 and Parkinson's disease, that are associated with the misfolding of polypeptides. Comparison of the results obtained from our MD simulations of an Aβ fragment (residues 12 to 28) in the presence and absence of our candidate compounds seem to indicate that the best aggregation inhibitors are able to modulate the secondary structure of the peptide, partially precluding the formation of a hairpin aggregation template.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE REFERENCIAS

1. A. Wimo, M. Prince. *World Alzheimer Report* **2010**; "The Global Economic Impact of Dementia" (Alzheimer's Disease International, London, 2010)
2. A. Wimo, L. Jönsson, A. Gustavsson, D. McDaid, K. Ersek, J. Georges, L. Gulácsi, K. Karpati, P. Kenigsberg, H. Valtonen. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2011,** *26,* 825–832
3. K. Mauer. *J. Neural Transm.* **2006,** *113,* 1597–1601
4. K. A. Jellinger. *J. Neural Transm*. **2006**, *113,* 1603-1623
5. M. Kidd. *Nature* **1963,** *197,* 192-193
6. R.D. Terry. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **1963,** *22,* 629-642
7. R.D. Terry, N.K. Gonatas, M. *Weiss. Am. J. Pathol.* **1964,** *44,* 269-297
8. G. Blessed, B.E. Tomlinson, M. Roth. *Br. J. Psychiatry* **1968,** *114,* 797-811
9. B.E. Tomlinson, G. Blessed, M. Roth. *J. Neurol. Sci.* **1970,** *11*, 205-242
10. R.D. Terry, E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, R. Katzman. *Ann. Neurol.* **1991**, *30*, 572-580
11. K.T. Jacobsen, K. Iverfeldt. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66,* 2299-2318
12. D.J. Selkoe. *Neuron* **1991**, *6,* 487-498
13. J.A. Hardy, G.A. Higgings. *Science* **1992,** *25,* 184-185
14. D.J. Selkoe. *Nature Med.***2011,** *17,* 1060-1065
15. D.M. Walsh, D.J. Selkoe. *Neuron* **2004**, *44*, 181-193
16. M. Obulesu, R. Venu, R. Somashekhar. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 1329-1335
17. J.Q. Trojanowski, V.M-Y Lee. *Nature Neurosci.* **2005,** *8*, 1136-1137
18. M. Citron. *Nature Rev. Drug Disc.* **2010**, *9,* 387-398
19. P. Anand, B. Singh, N. Singh. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20,* 1175-1180
20. F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, M. Kivipelto. *Lancet. Neurol.* **2010**, *9*, 702-716
21. G. Miller. *Science.* **2012**, *337*, 790-792
22. R. Vassar, B.D. Bennett, S.Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendíaz, P. Dennis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J-C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron. *Science* **1999**, *286*, 735-741
23. M.C. Villaverde, L. González-Louro, F. Sussman. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 980-990
24. J. Yuan, S. Venkatraman, Y. Zheng, B.M. McKeever, L.W. Dillard, S.B. Singh. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4156-4180
25. L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, J. Tang. *Science* **2000**, *290,* 150-153
26. V. Mbazima, B. da Costa Días, A. Omar, K. Jovanovic, S. F. Weiss. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 1150-1163
27. S.J. Stachel, C.A. Coburn, T.G. Steele, K.G. Jones, E.F. Loutzenhiser, A.R. Gregro, H.A. Rajapakse, M.T. Lai, M.C. Crouthamel, M. Xu, K. Tugusheva, J.E. Lineberger, B.L. Pietrak, A.S. Espeseth, X.P. Shi, E. Chen-Dodson, M.K. Holloway, S. Munshi, A.J. Simon, L. Kuo, J.P. Vacca. *J. Med. Chem.* **2004,** *47,* 6447-9450
28. D.B. Northrop. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34,* 790-797
29. R. Sannerud, I. Declerck, A. Peric, T. Raemaekers, G. Menéndez, L. Zhou, B. Veerle, K. Coen, S. Munck, B. De Strooper, G. Schiavo, W. Annaert. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13893-13894
30. C.I. Stains, K. Mondal, I. Ghosh. *ChemMedChem.* **2007**, *2*, 1674-1692
31. J.S. Albert. *Prog. Med. Chem.* **2009**, *48,* 133-161
32. C.W. Murray, O. Callaghan, G. Chessari, A: Cleasby, M. Congreve, M. Frederikson, M.J. Hartshorn, R. McMenamin, S. Patel, N. Wallis. *J. Med. Chem.* **2007**, *50,* 1116-1123
33. O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A.M. D'Ursi, P.A. Temussi, D. Picone. *Eur. J. Biochem.* **2002,** *269*, 5642-5648
34. T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, R. Riek. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005,** *102,* 17342-17347
35. M. Convertino, A. Vitalis, A. Caflisch. *J. Biol. Chem.* **2011**, *155*, 13065-13074
36. Y. S. Lee, H. Y. Kim, Y.S. Kim, J. H. Seo, E. J. Roh, H. Han, K. J. Shin. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20,* 4921-4935
37. T. Richard, Y. Papastamoulis, P. Waffo-Teguo, J.P. Monti. *Biochim. Byophis. Acta* **2013**, *1830*, 5068-5074
38. M. Convertino, R. Pellarin. M. Catto, A. Carotti, A. Caflisch. *Protein Sci.* **2009,** *18*, 792-800
39. M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P.H. Axelsen, I. Silman, J.L. Sussman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90,* 9031-9035
40. Y.Zhou, S. Wang, Y. Zhang. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8817-8825
41. H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman. *Chem-Biol. Inter.* **2010**, *187,* 10-22
42. N.C. Inestrosa, A. Álvarez, C.A. Pérez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C. Soto, J. Garrido. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891
43. E.H. Rydberg, B. Brumshtein, H.M. Greenblatt, D.M. Wong, D. Shaya, L.D. Willians, P.R. Carlier, Y.-P. Pang, I. Silman, J. L. Sussman. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500
44. R. Schliebs, T. Arendt. *J. Neural. Transm.* **2006,** *113*, 1625-1644

45. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, JC. Fontecilla-Camps, F. Nachon. *J. Biol. Chem.* **2003,** *278*, 41141-41147
46. M.I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, G.C. González-Muñoz, S. Conde, M.G. López, M. Villarroya, A.G. García, M.I. Rodríguez-Franco. *J. Med. Chem*. **2010**, *53,* 4927-4937
47. R. Postina. *J. Neurochem.* **2012,** *120* (sup. 1), 46-54
48. S. Sinha, I. Lieberburg. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **1999,** *96*, 11049-11053
49. X.Li, S. Dang, C. Yan, X. Gong, J. Wang, Y. Shi. *Nature* **2013,** *493*, 56-61
50. Para más información sobre Notch, véase por ejemplo: B. Westhoff, I.N. Colaluca, G. D'Ario, M. Donzelli, D. Tosoni, S. Volorio, G. Pelosi, L. Spaggiari, G. Mazzarol, G. Viale, S. Pece, P.P. Di Fiore. *Proc. Natl. Acad. USA* **2009**, *106*, 22293-22298
51. P. T. Lansbury Jr. *Nature Med.* **2004**, *10*, S51-S57
52. M.L. Bolognesi, R. Matera, A. Minarini, M. Rosini, C. Melchiorre. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13,* 303-308
53. A.K. Ghosh. "Aspartic proteases as therapeutic targets". *Weinheim: Wiley-VCH* **2010**
54. C. Boss, O. Corminboeuf. C. Grisostomi, T. Weller. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 295-317
55. M.K. Holloway, P. Hunt, G.B. McGaughey. *Drug Dev. Res.* **2009,** *70,* 70-93
56. M.J. Meyers, D.E. Goldberg. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 445-455
57. L.A. Braga-Silva, A.L. Santos. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2401-2419
58. E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prébois, H. Rochefort, F. Vignon. *Cancer Lett.* **2006**, *237,* 167-179
59. H. Rochefort, M. García, M. Glondu, V. Laurent, E. Liaudet, J.M. Rey, P. Roger. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 157-170
60. B.M. Dunn, "Structure and function of the aspartic proteinases". *New York; Plenum Press* **1991**
61. M.N.G. James. "Aspartic proteinases: Retroviral and cellular enzimes." *New York: Plenum Press* **1998**
62. J- Varghese. "BACE: Lead target por orchestrated therapy of Alzheimer's disease." *Weinheim: Wiley-VCH* **2010**
63. M.R. Weir. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2007,** *13,* 739-766
64. N.D. Rawlings, A.J. Barret, A. Bateman. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *49*. D343-359. Base de datos disponible en: http://www.merops.sanger.ac.uk
65. J.H. Nonthrop. *J. Gen. Physiol.* **1930**, *13*, 739-766
66. T.D.H. Bugg. "Introduction to enzime and coenzime chemistry", 2nd ed. *Oxford: Blackwell* **2004**.
67. L.J. Hyland, T.A. Tomaszek Jr., T.D. Meek. *Biochemistry* **1991**, *40*, 8454-8463
68. N.S. Andreeva, L.D. Rumsh. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2439-2450
69. B. Veerapandian, J.B. Cooper, A. Sali, T.L. Blundell, R.L. Rosati, B.W. Dominy, D.B. Damon, D.J. Hoover. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 322-328
70. M.N.G. James, A.R. Sielecki, K. Hayakawa, M.H. Gelb. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3872-3886
71. .M. Silva, R.E. Cachau, H.L. Sham, J.W. Erickson. *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 321-346
72. W.E. Harter Jr., D.L. Beveridge. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3883-3886
73. H. Park, S. Lee. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125*, 16416-16422
74. D. Huang, U. Lüthi, P. Kolb, M. Cecchini, A. Barberis, A. Caflisch. *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 5436-5443
75. R. Friedman, A. Caflisch. *FEBS Lett.* **2007,** *581*, 4120-4124
76. B.G. Rao, U.C. Singh. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6735-6750
77. N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, N. Liao, C.H. Reynolds, K.M. Merz Jr., *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1057-1069
78. R. Rajamani, C.H. Reynolds. *J. Med. Chem*. **2004,** *47,* 5159-5166
79. J. Trylska, J. Antosiewicz, M. Geller, C.N. Hodge, R.M. Klabe, M.S. Head, M.K. Gilson. *Protein Sci.* **1999**, *8*. 180-195
80. T. Polgár, G.M. Keserü. *J. Med. Chem.* **2005,** *48,* 3749-3755
81. J.L. Domínguez, T. Christopeit, M.C. Villaverde, T. Gossas, J.M. Otero, S. Nyström, V. Baraznenok, R. Lindström, U.H. Danielson, F. Sussman. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7255-7263
82. F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, J.C. Estévez, R.J. Estévez. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3084-3085
83. J.L. Domínguez, T. Gossas, M.C. Villaverde, U.H. Danielson, F. Sussman. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4838-4847
84. T. Gossas, U.H. Danielson. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16,* 203-212
85. P.O. Markgren, M.T. Lindgren, K. Gertow, R. Karlsson, M. Hämäläinen, U.H. Danielson. *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 207-218
86. M. Karlsson, Y.M. Pavlov, M. Malmqvist, B. Persson, M. Ehrenberg. *Biochimie* **1999**, *81*, 995-1002
87. W. Im, M.S. Lee, C.L. Brooks III. *J. Comput. Chem*. **2003**, *24*. 1691-1702
88. V.Z. Spassov, L. Yan. *Protein Sci.* **2008,** *17,* 1955-1970
89. L. Hong, R. Turner III, G. Koelsch, D. Shin, A.K. Ghosh, J. Tang. *Biochemistry* **2002**, *41,* 10963-10967. Detalles sobre la síntesis del inhibidor OM00-3 se pueden encontrar en la Tesis Doctoral de José Manuel Otero Casas (2007), Universidad de Santiago de Compostela (España).

90. H.A. Rajapakse, P.G. Nantermet, H.G. Selnick, S. Munshi, G.B. McGaughey, S.R. Lindsley, M.B. Young, M.T. Lai, A.S. Espeseth, X.P. Shi, D. Colussi, B. Pietrak, M.C. Crouthamel, K. Tugusheva, Q. Huang, M. Xu, A.J. Simon, L. Kuo, D.J. Hazuda, S. Graham, J.P. Vacca. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7270-7273
91. N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dundson, P. East, J. Hawkins, C. Howes, I. Hussain, P. Jeffrey, G, Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne. *J. Med. Chem.* **2008,** *51,* 3313-3317
92. A.K. Ghosh, N. Kumaragurubaran, L. Hong, S. Kulkarni. X. Xu, H.B. Miller, D.S. Reddy, V. Weerasena, R. Turner, W. Chang, G. Koelsch, J. Tang. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18,* 1031-1036
93. M. Back, K. Nyhlén, I. Kvarnstörm, S. Appelgren, N. Borkakoti, K. Jansson, J. Lindberg, S. Nyström, A. Hallberf, S. Rosenquist, B. Samuelsson. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9471-9486
94. M. Citron, T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Leberburg, D.J. Selkoe. *Nature* **1992**, *360,* 672-674
95. Discovery Studio vs. 2.1, 2.5 y 3.0. Accelrys Inc. San Diego, CA.
96. F.A. Momany, V.J. Klimkowski, L. Schäfer. *J. Comput. Chem.* **1990,** *11*, 654-662
97. B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217
98. A.K. Ghosh, G. Bilcer, C. Hardwood, R. Kawahama, D. Shin, K.A. Hussain, L. Hong, J.A. Loy, C. Nguyen, G. Koelsch, J. Ermolieff, J. Tang. *J. Med. Chem.* **2001**, *44,* 2865-2868
99. S. Piana, D. Sebastiani, P. Carloni. M. Parrinello. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8730-8737
100. L. Coates, H.F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, J. Cooper. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130,* 7235-7237
101. R.T. Turner, G. Koelsch III, L. Hong, P. Castanheira, A. Ghosh, J. Tang. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10001-10006
102. S.J. Satchel, C.A. Coburn, D. Rush, K.L.G. Jones, H. Zhu, H. Rajapakse, S.L. Graham, A. Simon, M.K. Holloway, T.J. Allison, S.K. Munshi, A.S. Espeseth, P. Zuck, D. Colussi. A. Wolfe, B.L. Pietrak, M.T. Lai, J.P. Vacca. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2977-2980
103. P.A. Frey, S.A. Whitt, J.B. Tobin, *Science* **1994**, *264.* 1927-1930
104. P.M.D. Fitzgerald, B.M. McKeever, J.F. VanMiddlesworth, J.P. Springer, J.C. Heimbach, C.T. Leu, W.K. Herber, R.A.F. Dixon, P.L. Darke. *J. Biol. Chem* **1990**, *265*, 14209-14219
105. L. Coates, P.T. Erskine, S. Mall, R. Gill, S.P. Wood, D.A.A. Myles, J. Cooper. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 559-566.
106. M. Fornabaio, P. Cozzini, A. Mozzarelli, D.J. Abraham, G.E. Kellog. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4487-4500
107. H.O. Andersson, K. Fridborg. S. Löwgren, M. Alteman, A. Mühlman, M. Björsne, N. Garg. L. Kvarnström, W. Schaal; B. Classon, A. Karlén, U.H. Danielsson, G. Ahlsén, U. Nillroth, L. Vrang, B. Öberg, B. Samuelsson, A. Hallberg. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1746-1758
108. B. Mahalingam, Y.F. Wang, P.I. Boross, J. Tozser, J.M. Louis, R.W. Harrison. I.T. Weber. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271,* 1516-1524
109. Y. Tie, A.Y. Kovalevsky, P. Boross. Y.F. Wang, A.K. Ghosh, J. Tozser, R.W. Harrison, I.T. Weber, *Proteins* **2007**, *67*, 232-242
110. N.M. King, M. Prabu-Jeyabalan, R.M. Bandaranayake, M.N.L. Nalam, E.A. Nalivaika, A. Özen, T. Haliloglu, N.K. Yilmaz, C.A. Schiffer. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7,* 1536-1546
111. K. Bäckbro, S. Löwgren, K. Österlund, J. Atepo, T. Unge, J. Hultén, n.M. Bonham, W. Schaal, A. karlén, A. Hallberg. *J. Med. Chem.* **1997,** *40,* 898-902
112. J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, M. Uchimaya. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2007,** *21*, 681-691
113. Epik v. 2.2, Schrödinger, *LLC New York, NY,* **2011**
114. T. Yamazaki, L.K. Nicholson, D.A. Torchia, P. Wingfield, S.J. Stahl, J.D. Kaufman, C.J. Eyermann, C.N. Hodge, P.Y.S. Lam, Y. Ru, P.K. Jadhav, C.H. Chang, P.C. Weber. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116,* 10791-10792
115. Y.X. Wang, D.I. Freedberg, T. Yamazaki, P.T. Wingfield, S.J. Stahl, J.D. Kaufman, Y. Kiso, D.A. Torchia. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9945-9950
116. M. Adachi. T. Ohhara, K. Kurihara, T. Tamada, E. Honjo, N. Okazaki, S. Arai, Y. Shoyama, K. Kimura. H. Matsumura, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, Y. Mori, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, R. Kuroki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009,** *106,* 4641-4646
117. R: Smith; I.M. Bereton, R.Y. Chai, S.B.H. Kent. *Nat Struct. Biol.* **1996,** *3,* 946-950
118. T. Polgár, C. Magyar, I. Simon, G.M. Keserü *J. Chem. Inf. Model* **2007**, *47*, 2366-2373
119. P. Kacker, M. Masetti, M. Mangold, G. Bottegoni, A. Cavalli. *J. Chem. Inf. Model* **2012**, *52*, 1079-1085
120. . Barman, R. Prabhakar, *J. Chem. Inf. Model.* **2012,** *52,* 1275-1287
121. P.D. Edwards, J.S. Albert, M. Sylvester, D. Aharony, D. Andisik, O. CAlalghan, J.B. Campbell, R.A. Carr, G. Chessari, M. Congreve, M. Frederikson, R.H.A. Folmer, S. Geschwindner, G. Koether, K. Kolmodin, J. Krumrine, R.C. Mauger, C.W. Murray, L.L. Olsson, S. Patel, N. Spear, G. Tian. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5912-5925
122. M. Congreve, D. Aharony, J. Albert, O. Callaghan, J. Campbell, R.A.E. Carr, G. Chessari, S. Cowan, P.D. Edwards, M. Frederickson, R. McMenamin, C.W. Murray, S. Patel, N. Wallis. *J. Med. Chem.* **2007,** *50,* 1124-1132

123. W. Yang, R.V. Fucini, B.T. Fahr, M. Randal, K.E. Lind, M.B. Lam, W. Lu, Y. Lu, D.R. Cary, M.J. Romanowski, D. Colussi, B. Pietrak, T.J. Allison, S.K. Munshi, D.M. Penny, P. Pham, J. Sun, A.E. Thomas, J.M. Wilkinson, J.W. Jacobs, R.S. McDowll, M.D. Ballinger, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4488-4499
124. A. Kulgstatter, M. Stahl, J.W. Peters, W. Huber, M. Stihle, D. Schlatter, J. Benz, A. Rug, D. Roth, T. Enderle, M. Henning *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1304-1307
125. Y.S. Wang, C. Strickland, J.H. Voigt, M.E. Kennedy, B.M. Beyer, M.M. Senior, E.M. Smith, T.L. Nechuta, V.S. Madison, M- Czarniecki, B.A. McKittrick, A.W. Stamford, E.M. Parker, J.C. Hunter, W.J. Greenlee, D.F. Wyss. *J. Med. Chem.* **2010,** *53,* 942-950
126. J. Madden, J.R. Dod, R. Godemann, J. Kraemer, M. Smith, M. Biniszkiewicz, D.J. Hallet, J. Barker, J.D. Dyekjaer, T. Hesterkamp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5329-5333
127. Resultados de Scifinder calculados empleando ACD/Labs Software V 11.02. Advanced Chemistry Development Inc. Toronto, ON
128. GOLD. Versión 5.1. Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge (Reino Unido)
129. M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445
130. C.A. Baxter, C.W. Murray, D.E. Clark, D.R: Westhead, M.D. Eldridge, *Proteins* **1998,** *33*, 367-382
131. G. Jones, P. Willet, R.C. Glen. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*. 43-53
132. G. Jones, P. Willet, R.C. Glen, A.R. LEach, R. Taylor. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748
133. O. Korb, T.Stützle, T.E. Exner, *J. Chem. Inf. Mol.* **2009**, *49,* 84-86
134. D. Hoffman, B. Kramer, T. Washio, T. Steinmetzer, M. Rarey, T. Lengauer. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4422-4433
135. M.P. Glesson, D. Gleeson. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49,* 1437-1448
136. M.L. Verdonk, I. Giangreco, R.J. Hall, O. Korb. P.N. Mortenson, C.W. Murray. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5422-5431
137. A.P. Graves, D.M. Shivakumar, S.E. Boyce, M.P. Jacobson, D.A. Case, B.K. Shoichet. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 914-934
138. R.Brenk, S.W. Vetter, S.E. Boyce, D.B. Goodin, B.K. Shoichet. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1449-1470
139. R. Scherzer-Attali, R. Pellarin, M. Convertino, A. Frydman-Marom, Nirit Egoz-Matia, S. Peled, M. Levy-Sakin, D.E. Shalev, A. Caflisch, E. Gazit, D. Segal. *PLOS One*. **2010**, *5*, e11101
140. J.J. Irwin, B.K. Shoichet. *J. Chem Inf. Model.* **2005**, *45(1)*, 177-182
141. SciFinder © 2013 American Chemical Society.
142. a) D. Weininger. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31-36 b) D. Weininger, A. Weininger, J.L. Weininger. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, *29*, 97-101 c) D. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1990**, *30*, 237-243
143. S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, J. Yon. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 407-416
144. U. Haberthür, A. Caflisch. *J. Comp. Chem.* **2007**, *29,* 701-715
145. G.L. Ellman, D. Courtney, V. Jr. Andres, R.M. Featherstone. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95
146. M. Necula, R.Jayed, S. Milton. C.C. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10311-10324
147. M.N. Sabbagh, M.R. Farlow, N. Relkin, T.G. Beach. *Alzheimer's & Dementia* **2006**, *2*, 118-125
148. Ver trabajo titulado "GOLD scoring function performance against the DUD decoy/active set " disponible en la sección de recursos de la web del Cambridge Crystallographic Data Centre, http://www.ccdc.cam.ac.uk/
149. V. Simeon-Rudolf, Z. Kovarik, Z. Radić, E. Reiner. *Chem. Biol. Inter.* **1999,** *119-120***,** 119-128
150. M. Mazzei, E. Niueddu, M. Miele, A. Balbi, M. Ferrone, M. Fermeglia, M.T. Mazzei, S. Pricl, P. La Colla, F. Marongiu, C. Ibba, R. Loddo. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2591-2605
151. P. Taylor, J. Lwebuga-Musaka, S. Lappi, J. Rademacher. *Mol. Pharmacol.* **1974**, *10*, 703-708
152. S. Zhang, L. Hedskog, C.A. Hansson Petersen, B. Winblad, M. Ankarcrona. *J. Alzheimer's Diease* **2010**, *21*, 389-402
153. K.S. McMillan, J. Naidoo, J. Liang, L. Melito, N.S. Williams, L. Morlock, P.J. Huntingon, S.J. Estill, J. Longgood, G.L. Becker, S.L. McKnight, A.A. Pieper, J.F. de Brandaber, J.M. Ready. *J. Am. Chem. Soc* **2011**, *133*, 1428-1437
154. J.L. Domínguez, M.C. Villaverde, F. Sussman. *J. Comp. Aid. Mol. Design* **2013,** *27,* 403-417
155. S.-Y. Li, N. Jiang, S.-S, Xie, K.D.G. Wang, X.-B-. Wang, L.-Y. Kong. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 801-814
156. L.E. Buchanan, E.B. Dunkelberger, H.Q. Tran, P.-N. Cheng, C.-C. Chiu, P.Cao, D.P. Raleigh, J.J. de Pablo, J.S. Nodwick, M.T. Zanni. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19285-19290

THESIS APPENDIX. PUBLICATIONS.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIOCHEMISTRY
including biophysical chemistry & molecular biology
Article

Biochemistry **2010,** *49,* 7255–7263 7255
DOI: 10.1021/bi100637n

Effect of the Protonation State of the Titratable Residues on the Inhibitor Affinity to BACE-1[†]

José L. Domínguez,[‡] Tony Christopeit,[§] M. Carmen Villaverde,[‡] Thomas Gossas,[§] José M. Otero,[‡] Susanne Nyström,[∥] Vera Baraznenok,[∥] Erik Lindström,[∥] U. Helena Danielson,*[,§] and Fredy Sussman*[,‡]

[‡]*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain,* [§]*Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden, and* [∥]*Medivir AB, Lunastigen 7, Huddinge, Sweden*

Received April 26, 2010; Revised Manuscript Received July 20, 2010

ABSTRACT: BACE-1 is one of the aspartic proteases involved in the cleavage of β amyloid peptide, an initial step in the formation of amyloid plaques whose toxicity induces neuron death in Alzheimer's disease patients. One of the central issues in the search of novel BACE-1 inhibitors is the optimum pH for the binding of inhibitors to the enzyme. It is known that the enzyme has optimal catalytic activity at acidic pH, while cell active inhibitors may bind optimally at higher pH. In this work we determine the effect of the pH on the affinities of a set of inhibitors, with a variety of chemical motifs, for the ectodomain region of BACE-1 by a surface plasmon resonance (SPR) biosensor based assay. In order to understand the molecular interactions that underlie the diverse optimum pH for the binding of the various inhibitors as observed experimentally, we have calculated the titration curves for a set of BACE-1 ligand complexes. The results indicate that the pK_a values of the titratable residues of the protein depend on the nature of the ligand involved, in disagreement with previous work. The enzyme−inhibitor structures with the resulting protonation states at pH values 4.5 and 7.4 served as the starting point for the prediction of the pH-dependent binding ranking. Our calculations reproduced the entire affinity ranking observed upon pH increase and most of the binding trends among inhibitors, especially at low pH. Finally, our cell-based assays indicate a possible correlation between high inhibitor affinity at both acidic and neutral pH values, with optimal cell response, a result that may open new venues for the search of potent BACE-1 inhibitors that are active at the cellular level.

Alzheimer's disease (AD)[1] is a widespread, neurodegenerative, dementia-inducing disorder which typically begins in middle to late adult life (*1*). It is characterized by synaptic loss and neuronal death in the cerebral cortex and the hippocampus. The major observed lesions are amyloid plaques, which are formed by the amyloid peptide (Aβ) fibril aggregates (*1*, *2*). The Aβ peptide, which contains 40−42 amino acids, is the product of a hydrolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP, a type I transmembrane glycoprotein), a process that is catalyzed by a tandem of two proteases identified as β- and γ-secretases (*2*−*7*). It has been demonstrated that the former enzyme (also referred to as BACE-1 and memapsin 2) participates in the rate-limiting step of the hydrolytic process that leads to the APP fragments, a fact that has converted β-secretase into a major target for drugs against Alzheimer's disease (*3*−*7*). As a result, many pharmaceutical companies and academic institutions became involved in drug discovery efforts targeting this enzyme (*2*, *8*).

The main aim of these efforts is the discovery of small molecular weight compounds that can trespass the blood brain barrier. Many first generation peptidomimetic inhibitors with low nanomolar affinities in enzyme-based assays are not active in cell-based assays because of the limited penetration across cell membranes (*9*). Higher bioavailability may be precluded (in part) by the large number of polar groups present in peptidic inhibitors. In principle, the automated screening of compounds belonging to chemical libraries or resulting from combinatorial chemistry could provide nonpeptidic inhibitors with the right balance of polar and nonpolar groups. Nevertheless, the earliest high-throughput screening (HTS) of putative β-secretase inhibitors did not prove to be very successful. For instance, Coburn et al. reported that a single molecule (a 1,3,5-trisubstituted benzene) emerged as a hit from a HTS of a multimillion compound library (*10*). Other approaches to inhibitor design have relied on small fragment-based screening (FBS) by X-ray and NMR techniques (*11*). These protocols have led to the discovery of chemically diverse nonpeptidic inhibitors that in some cases have a novel binding mode that displays a more open active site of the enzyme (*12*).

[†]This work was supported by financial aid from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain, and the Xunta of Galicia to M.C.V. and F.S., the Carl Tryggers Stiftelse för Vetenskaplig Forskning, Sweden, to U.H.D., and scholarships to J.L.D. from the MEC and to T.C. from the Sven and Lilly Lawski Fund. The Supercomputing Center of Galicia (CESGA) provided computer time.

*To whom correspondence should be addressed. (F.S.) Phone: 34-881-814402. Fax: 34-981-595012. E-mail: fredy.sussman@usc.es. (U.H.D.) Phone: +46 18 4714545. Fax: + 46 18 558431. E-mail: helena.danielson@biorg.uu.se.

[1]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; BACE-1, β-site APP cleaving enzyme; APP, amyloid precursor protein; SPR, surface plasmon resonance; FBS, fragment-based screening; EM, energy minimization; NOE, nuclear Overhauser effect; MD, molecular dynamics; CHARMM, chemistry at Harvard molecular mechanics; ABNR, adopted basis set Newton−Raphson; NVT, MD protocol where the number of molecules, the volume, and the temperature are kept constant; GBSW, generalized Born with simple switching; DS, discovery studio; HTS, high-throughput screening; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HE, hydroxethylene; HEA, hydroxylethylamine; RU, resonance units.

© 2010 American Chemical Society
Published on Web 07/26/2010

There are several issues related to the computer-aided design of novel ligands that could enhance the success of HTS and FBS protocols but that have not been fully addressed yet. One of the most vital ones is the protonation state of the many buried acidic residues found in this protein, including the active site Asp dyad, which lends to this enzyme an optimal catalytic activity at low pH (*3*). Most of the inhibitors developed at the earliest stages were transition state analogues with various degrees of peptidic nature and probably have their highest affinity at the pH value optimal (4.5) for activity (*2*, *13*). But many subsequent inhibitor design cycles, like the one based on small fragment search by X-ray crystallography, have generated compounds that anchor themselves to the Asp dyad by amine groups (*12*), and it is not clear what their effect on the protonation state of buried acidic residues like the ones that belong to the Asp dyad will be. There have been many attempts to search for putative inhibitors by an *in silico* HTS screening, but they have always relied on a single BACE-1 Asp dyad protonation state, in spite of the large chemical diversity found in the chemical libraries used in HTS. Nevertheless, some authors claim that a given Asp dyad protonation state results in an enrichment of high-affinity molecules in the final set, when used instead of alternative protonation states (*14*, *15*).

There have been many attempts to predict the charged state of the active site Asp dyad by computational methods that include molecular mechanics (*16*), quantum mechanical calculations (*17*), or a combination of both protocols (*18*). The calculations were performed on a single complex formed by BACE-1 bound to inhibitor **OM99-2**. The results of those calculations support the hypothesis that the most favored Asp dyad charge state is the one that has only one of the Asp residues protonated. There has been only one attempt to calculate the pH dependence on the active site protonation state (*15*).

BACE-1 inhibitors bind to this enzyme in cellular compartments that probably display a neutral pH. Nevertheless, BACE-1 is most active at an acidic pH (4.5−5.5). To bridge this disconnect, we have studied the binding affinity of a set of chemically diverse inhibitors by surface plasmon resonance (SPR) biosensor technology at the pH of optimal activity for BACE (i.e., 4.5) and at a pH close to a neutral value that has been used in the X-ray studies of many BACE-1/inhibitor complexes (i.e., 7.4).

In order to understand the SPR biosensor observed pH dependence on ligand binding, we have calculated the titration curves for the enzyme−inhibitor complexes studied experimentally by an approximate solution of the Poisson−Boltzmann equation that employs a generalized Born approximation (*19*). These simulations afforded the protonation states of all titratable residues at both (4.5 and 7.4) pH values and allowed us to calculate the pH dependence of the binding affinities for those complexes. The calculated binding ranking pH dependence reproduces quite well the observed experimental trends for single inhibitors. Moreover, the underlying predicted protonation states indicate that the actual catalytic Asp dyad protonation state will depend strongly on the chemical structure of the inhibitor, in contrast to the consensus that has been arrived at in the literature. Our calculations explain the seemingly incongruous binding affinity pH dependence, providing a clear rationale based on the protonation states of the acidic residues (especially the Asp dyad), elicited by the chemically diverse inhibitors studied here.

Finally, our cell-based assays indicate that those inhibitors that display a high binding affinity at both acidic and neutral pH values present the best biological activity at the cell level, a result that opens new venues for the search of potent BACE-1 inhibitors that are effective at the cellular level.

MATERIALS AND METHODS

(*1*) *SPR Biosensor Interaction Analysis and Cellular Activity Studies*. (*a*) *Inhibitors*. The chemical structures of the inhibitors as well as the PDB codes of the complexes studied here are shown in Table 1. Inhibitors **I-2** (*20*), **I-3** (*21*), **I-4** (*22*), **I-5** (*23*), and **I-6** (*24*) were synthesized according to published procedures, while compound **I-1** (**OM99-2**) was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

(*b*) *Protein*. The ectodomain of BACE-1 (amino acids 42−446) was expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity according to previously published procedures (*25*).

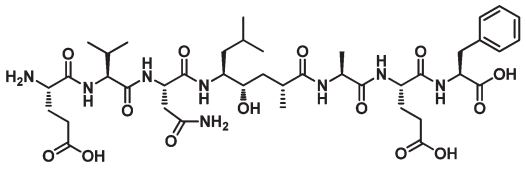
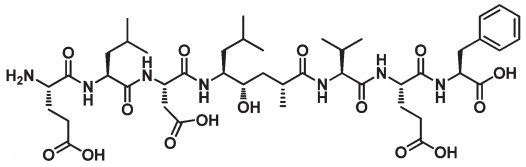
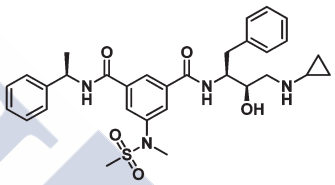
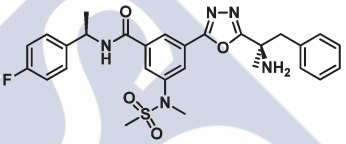
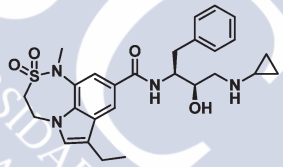
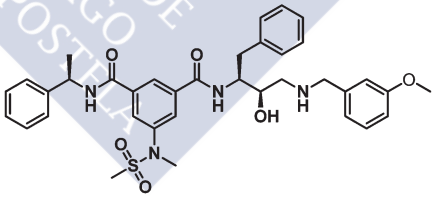
(*c*) *Preparation of Biosensor Surfaces*. All interaction studies were performed at 25 °C with a Biacore 2000 or a Biacore S51 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The interaction was measured in resonance units (RU) as a function of time, and presented graphically as sensorgrams, with data from a series of inhibitor concentrations overlaid for each experiment. Prior to immobilization of BACE-1, the buffer of the purified enzyme was changed to 10 mM sodium acetate, pH 4.5, and the concentration adjusted to 0.1 mg/mL. The protein was immobilized to CM5 sensor chips by amine coupling according to standard procedures (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The running buffer during immobilization was 0.01 M Hepes, pH 7.4, and 0.15 M NaCl. A reference flow cell was prepared by activation and deactivation of the sensor surface.

(*d*) *Inhibitor Interaction Studies*. The interaction studies for all inhibitors were performed at a flow rate of 30 μL/min and in a running buffer composed of 10 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 3% DMSO or 10 mM sodium acetate, pH 4.5, 0.15 M NaCl, and 3% DMSO. The inhibitors were diluted in running buffer and injected in two independent concentration series for 180 s. The dissociation was recorded until the inhibitor had cleared the surface, but at least for 600 s. A blank, consisting of running buffer, was injected before and after each concentration series.

BIAevalution 4.1 software (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) was used to analyze the data. The reference and an average of the blanks were subtracted from the data before determining the kinetic parameters using global nonlinear regression analysis and a 1:1 binding model with mass transfer. In order to compensate for bulk changes between the association and dissociation phase, an additional term for correction was included in the analysis model. The sensorgrams were normalized to the immobilized protein amount and the molecular weight of the compound.

(*e*) *Cellular Enzyme Activity Assay*. HEK293 cells stably expressing Swedish mutant APP (*26*) were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, PEST (50 units of penicillin/50 μg/mL streptomycin), and 200 μg/mL hygromycin at 37 °C and 5% CO_2. Cells of 2×10^4 per well were seeded into 96-well plates and left overnight to settle. Cells were washed with fresh media, and inhibitor was added at various concentrations in DMEM medium supplemented with FCS (10%) and hygromycin (200 μg/mL). The maximal DMSO concentration was kept below 1%. After 24 h, the cell culture media was harvested, and the amount of Aβ peptide was determined by Aβ x-40 ELISA (The Genetics Co.,

Table 1: Chemical Structures of the BACE-1 Inhibitors Studied

PDB code	Name	Structure
1FKN	OM99-2 (I-1)	
1M4H	OM00-3 (I-2)	
2B8L	I-3	
2IRZ	I-4	
2VNN[a]	I-5	
2VKM	I-6	

[a]The BACE-1−inhibitor complex for **I-5** was generated by homology with the **2VNN** complex.

Schlieren, Switzerland) according to instructions supplied by the manufacturer. The IC_{50} values were calculated from concentration−response curves using the Hill equation and GraphPad Prism software (San Diego, CA).

(*2*) *Simulation Protocols for pK_a and Binding Affinity Prediction.* (*a*) *Structure Preparation.* The structures studied in this work (see Table 1) were downloaded from the Protein Data Bank, and hydrogens were added using the Discovery Studio (DS) suite of programs (*27*). We excluded compound **I-6** from our simulation studies, since its slow dissociation rate as measured by SPR experiments only afforded a upper limit for its K_D value (K_D < 10 nM). Some of the structures have a segment missing between residues 158 and 169 (**2B8L**, **2IRZ**) or between residues 157 and 167 (**2VNN**). The missing loop was modeled in these complexes based on the template provided by the crystallographic structure of **1FKN**. Inspection of the incomplete structures indicated that the segments before the missing loop were frayed, making the insertion of the loop difficult. To avoid this problem, we adjusted the torsional angles of the unraveled residues to their values observed in the **1FKN** complex. Once this was achieved, the loop was put into place by attaching its N- and C-terminals to the protein. To optimize this segment of the structure, we performed an energy minimization (EM) on a protein segment that included the inserted strain and five residues to either side of the above-mentioned fragment. For this sake we used a steepest descent protocol with a 0.1 kcal/(mol Å^2) gradient tolerance, using a CHARMM force field (*28*) available in the Discovery Studio suite of programs (*27*). Since

the coordinates of the complex BACE-1/**I-5** have not been published, we have generated them from the **2VNN** complex by replacing the *m*-(trifluoromethyl)benzyl moiety in this complex (*23*) by a cyclopropane fragment, using as a template the conformation of inhibitor **I-3**, which also has the same fragment at its C-terminal end.

(*b*) *pK_a and Binding Affinity Prediction*. The pK_a values for all titrable residues at a range of pH values (2−12) were calculated by the protocol proposed by Spassov and Yan (*19*), implemented in Discovery Studio and named Calculation of Protein Ionization and Residue pK_a. This protocol, which employs a generalized Born approximation to reproduce solvent effects, allows for the iterative determination of the pK_a of interacting residues. The internal and external dielectric constants used in these calculations were 10 and 80, the ionic strength was 0.145, and the energy cutoff for clustering was 0.5 kcal/mol. The charges used in these calculations were obtained from the CHARMM force field (*28*). The protocol used here for the prediction of the pK_a value of ionizable residues (see Spassov and Yan (*19*)) applies to all residues of the protein and to the amino acids that form part of the inhibitor. Hence, this algorithm was able to predict the pK_a values (and hence the protonation fraction at a given pH) for the acidic amino acids in inhibitors **I-1** and **I-2** and the ionizable groups at their N- and C-terminal ends. The amino groups of inhibitors **I-3 to I-5** may have a pK_a value as high as 10 or 11, and hence we have left them charged.

These calculations produce titration curves that depict the degree of protonation of each ionogenic residue at every pH value. The DS module also generates the preponderant protonation state at a given pH value, placing a proton on all residues that have a protonation fraction above 0.5. In some BACE-1−inhibitor complexes it was found that some residues (i.e., Asp228) have a protonation fraction just below 0.5. In this case, the alternative protonation state (i.e., protonated Asp228) was also generated and used for affinity calculations (see below).

For our binding affinity calculations we chose the protonation states predicted as the prevalent ones at pH 4.5 and 7.4 on the basis of the calculated protonation fraction for each residue by the pK_a predictor DS module. The resulting structures were subjected to a multistep molecular mechanics optimization protocol. The first part incorporated two energy minimization protocols devoted to optimize the proton position and the hydrogen bond ligand−protein network observed in the crystallographic structure. In the first EM we fixed all heavy atoms, while in the second we placed NOE constraints on the heavy atoms that participate as donors and acceptors in hydrogen bonds between the ligand and the protein. Each of the EM had two segments: the first one was an EM steepest descent segment of 2000 steps, and the second one was a stage of 50000 steps with an ABNR optimization protocol. The tolerance gradient in all of these calculations was 0.001 kcal/(mol Å^2). The resulting structure was subjected to a NVT molecular dynamics (MD) protocol close to 0.5 ns in length, consisting of 6 ps of heating, 60 ps of equilibration, and 400 ps of production at 300 K. For all of the EM and MD calculations we used an implicit solvation term based on the generalized Born approach with simple switching (GBSW) (*29*). In the MD production stage molecular conformations were collected every 2 ps for subsequent ligand−protein analysis by a scoring function built upon the difference in energy between the enzyme−inhibitor complex and its components and averaged over a set of MD generated conformations. Hence the binding affinity scoring function can be written as

$$\langle \Delta G_{\text{bind}} \rangle = \langle \Delta G_{\text{mm}}(\text{P:L}) - \Delta G_{\text{mm}}(\text{P}) - \Delta G_{\text{mm}}(\text{L}) + \Delta G_{\text{gb}}(\text{P:L}) - \Delta G_{\text{gb}}(\text{P}) - \Delta G_{\text{gb}}(\text{L}) \rangle \quad (1)$$

where ΔG_{mm} and ΔG_{gb} indicate the molecular mechanics CHARMM force field (*28*) and the GBSW solvation (*29*) components, respectively, for the protein−ligand complex (P:L), protein (P), and ligand (L).

All of the EM, MD, and analysis calculations were performed with the CHARMM suite of programs (*30*) in the 2400 processor Finisterrae supercomputer facility available at the Supercomputing center of Galicia (CESGA).

RESULTS AND DISCUSSION

(*1*) *Interaction Analysis*. The interaction of the BACE-1 inhibitors selected for this study (Table 1) with BACE-1 was analyzed at pH 4.5 and 7.4 (Figure 1). There were significant differences in the interactions for the different compounds and the two conditions. Compounds **I-3** to **I-5** interacted reversibly with the enzyme at both pH values (Figure 1). The affinities could be estimated (Table 2) by globally fitting a 1:1 interaction model with mass transfer limitation to the complete association and dissociation phase data. Due to the slow dissociation rates, the kinetics or affinities could not be determined for **I-1** and **I-2** at pH 4.5 and for **I-6** at both pH values. K_D values were defined to be below 10 nM for the sake of the quantitative analysis. The slow dissociation should be borne in mind when interpreting enzyme inhibition data for these compounds as steady-state inhibition experiments assume that the interaction is reversible, which clearly may not be the case.

(*2*) *Titration Behavior of Ionogenic Residues*. (*a*) *Active Site Asp Dyad Protonation State*. Figure 2 shows the calculated titration curves for the Asp dyad residues for the complexes studied here. It depicts the protonation fraction (*X*), the amount of each of the Asp dyad side chain residues that is protonated, as a function of the pH value. The most common feature in this figure is that the residue Asp32 stays protonated at a larger range of pH values than its Asp dyad partner, Asp228. Nevertheless, the chemical structure of the inhibitor seems to have a very strong influence on the actual shape of the titration curves and specifically on the protonation fraction at the pH values we are most interested in (i.e., 4.5 and 7.4). For instance, when BACE-1 is bound to peptidic inhibitors with a hydroxyethylene (HE) group in their isostere (**1FKN**, **1M4H**) (*13*, *20*), both Asp dyad partners remain protonated until or beyond pH 6, due to their large pK_a shift from their solution value (around 3.9), leading to a doubly protonated state at pH 4.5 and mainly a monoprotonated state at pH 7.4 for the Asp dyad. On the other hand, our calculations predict that the presence of an amino group that interacts with one or both members of the Asp dyad (**2B8L** (*21*), **2VNN** analogue (*23*), or **2IRZ** (*22*)) reduces their pK_a to values closer to the ones in solution (especially for the case of Asp228). The difference between the HE-based inhibitors and the latter type of ligands may reside in the fact that the ammonium group has a high pK_a value (ca. 10) and will remain charged inside the protein, providing a polar environment that helps to lower the Asp residue pK_a values. For this reason, the inhibitors containing hydroxylethylamine (HEA) or those containing an amino group

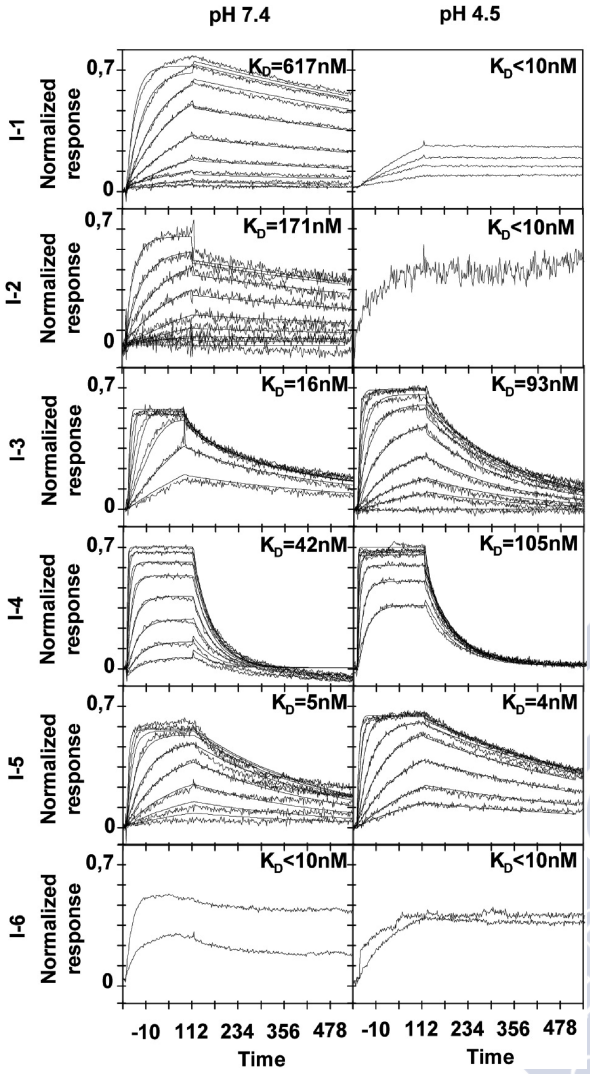


FIGURE 1: Interaction data for inhibitors **I-1** to **I-6** with BACE-1. The sensorgrams were normalized to the theoretical maximum signal estimated from the mass of the inhibitor and the amount of immobilized protein. A 1:1 binding model with mass transfer was fitted to the complete association and dissociation data, shown as solid lines, and the corresponding K_D values are given. For interactions where the affinities could not be estimated, an upper limit is given.

promote a monoprotonated dyad at a low pH value. At a higher pH value (7.4) this effect leads to an Asp dyad monoprotonated state (**2B8L**, **2VNN** analogue) or to a fully doubly charged Asp dyad as in the case of the complex **2IRZ**.

Our calculations are at variance with the consensus that was built by inference from experiments on other aspartic proteases (HIV-1 PR (*31*, *32*), endothiapepsin (*33*), etc.) and from the calculations performed on the BACE/**OM99-2** complex (*16*−*18*). The computer-assisted studies of the dyad protonation state reached a consensus that the Asp dyad is monoprotonated, but they disagree on which Asp residue the proton resides (*2*). The earliest attempt to assign a charge to the catalytic dyad was based on molecular dynamics (MD) simulations of the X-ray structure of the β-secretase complexed with **OM99-2** in solution (*16*). The starting points for the MD simulations assumed a charge of −1 for the Asp dyad but differed on the charge assignment, with either the Asp32 or the Asp228 ionized. Their results indicate that a neutral Asp32 and ionized Asp228 combination is the only option that maintains the intricate network of hydrogen bonds around the Asp dyad observed in the X-ray structure (*16*). This outcome is in agreement with our results for the **1FKN** complex at high pH value, the one used for the determining its structure by X-ray crystallography. Nevertheless, as pointed out above, our calculations suggest that the dyad is totally neutralized at the pH at which the enzyme presents its highest activity (pH 4.5). Other calculations carried out on the **1FKN** complex, like the linear scaling quantum approach, supported a monoprotonated state Asp dyad with a neutralized Asp228 and a charged Asp32 (*17*), in contrast to the conclusions based on the titration curves presented here.

(*b*) *Total Formal Charge as a Function of pH*. Most previous calculations aimed at studying the active site protonation state of BACE-1 have not taken into account the effect of the pH (*16*−*18*). Furthermore, the aim of the only pH-related study was to elucidate the Asp dyad protonation state and to apply it to an *in silico* screening of a large number of compounds with high chemical diversity (*15*). As far as we can judge, no effort has been made to study the protonation state of other ionizable residues. For most proteins that would not be a problem since most of the charged residues will be accessible to solvent and hence would remain charged for all pH values of interest. The aspartic protease family (to whom BACE-1 belongs) represents an exception in this regard, since they have a substantial number of titrable acidic residues that are partially or totally buried inside the protein. For this reason their pK_a values could be substantially larger than those of model compounds in solution, an effect that would depend on the polarity of the microenvironment where they are buried. Figure 3 graphically shows the BACE-1 charged states of the titrable residues. Perusal of this figure indicates that a number of acidic residues get ionized as the pH value increases. We have partly quantified this effect in Table 3, which lists the calculated pK_a values of the BACE-1 buried acidic residues. The results shown in this table indicate that the biggest shift in pK_a with respect to their values in solution is experienced by the residues of the active site Asp dyad. Interestingly enough, some of the buried acidic amino acids that experience a rise in their pK_a values are Glu residues, while some of the Asp residues reduce their pK_a value. Scrutiny of the **1FKN** structure indicates that some of the buried amino acids manage to keep low pK_a values (shown in Table 3) because they reside in a buried polar microenvironment, where sometimes they can form ion pairs with basic residues. Many of the residues listed in Table 3 have a pK_a value between 4.5 and 7.4 and hence will undergo a change in protonation state upon a pH increase, a result that will translate into changes in the catalytic efficiency as well as ligand affinity, the issue that will be discussed below.

(*3*) *Evaluating Binding Affinities at Different pH Values*. The starting point for the evaluation of the effect of the pH on ligand binding affinities was the structure of the BACE-1−ligand complexes in which the ionogenic residues are in their prevalent protonation states (as predicted by their calculated degree of protonation). In some systems the degree of protonation of the acidic residues, such as Asp228 (a member of the Asp dyad), is only slightly lower than 0.5, as in the case of the **2B8L** complex. Hence, our calculations predict nonnegligible populations in the neutral charge state for residues such as Asp228. In order to estimate the effect of the "minority" Asp dyad protonation state, we evaluated the ranking by using our scoring function (see eq 1

Table 2: Cell Assay Data and pH Effect on Experimental and Calculated Affinity Values

			K_D (nM)[c]		scoring function (kcal/mol)[d]	
PDB code	inhibitor	cellular IC_{50} (nM)[b]	pH 4.5	pH 7.4	pH 4.5	pH 7.4
1FKN	**OM99-2 (I-1)**	940	< 10	617 ± 2.8	−65.0 ± 3.4	−57.2 ± 3.1 (−55.0 ± 3.3)
1M4H	**OM00-3 (I-2)**		< 10	171 ± 19	−71.4 ± 2.8	−53.0 ± 3.4 (−53.1 ± 3.3)
2B8L	**I-3**	22	93 ± 17	16 ± 3	−59.8 ± 3.3 (−58.4 ± 3.3)	−61.0 ± 3.0
2IRZ	**I-4**	86	105 ± 34	42 ± 20	−45.8 ± 3.8	−53.2 ± 2.4
2VNN[a]	**I-5**	3	4 ± 0.3	5 ± 0.8	−45.2 ± 3.6	−45.5 ± 3.9
2VKM	**I-6**	0.1	< 10	< 10		

[a]**2VNN** analogue. [b]Inhibition of Aβ production in HEK293 cells stably transfected with Swedish mutant APP. [c]The standard deviations are based on at least two independent experiments. [d]Values in parentheses were calculated by weighting the affinities with their protonation fraction states when those values are close to 0.5.

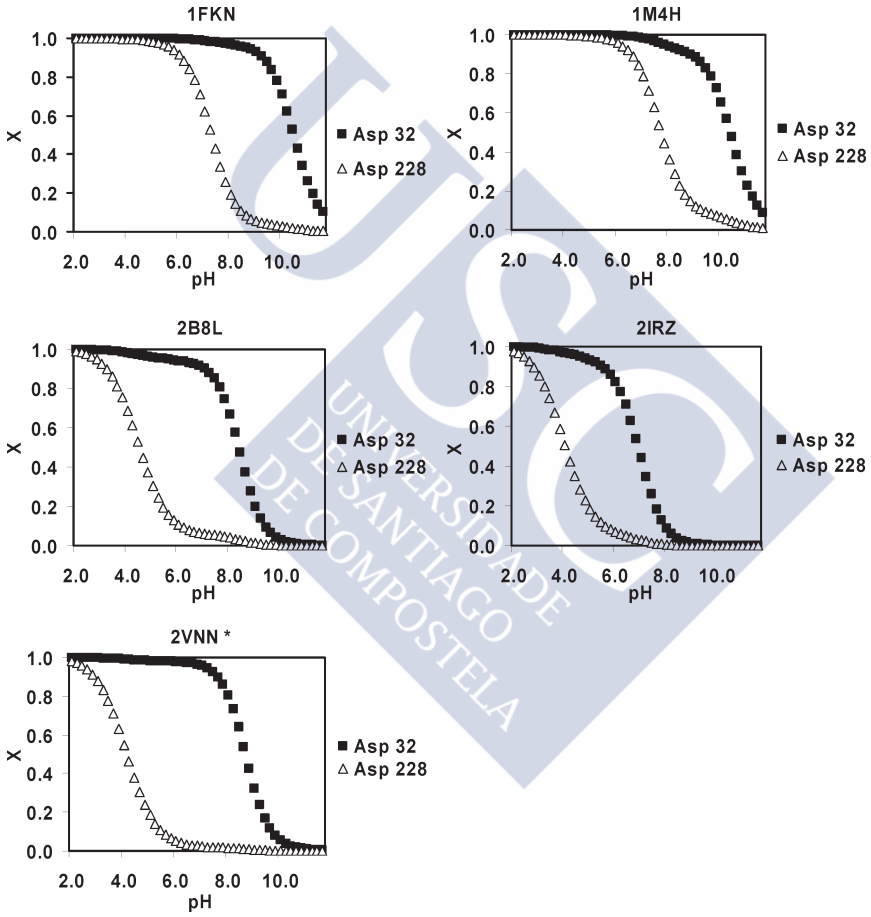


FIGURE 2: Titration curves for the active site Asp dyad in BACE-1. The titration curves show the fraction protonated (X) as a function of pH for Asp32 (black squares) and Asp228 (white triangles) in the BACE-1−inhibitor complexes studied in this work.

in Materials and Methods section) with the alternative Asp228 protonation state as well. The final inhibitor affinity prediction was obtained by weighting the calculated scoring function of the BACE-1−ligand complexes in both protonation states by each of the protonation fractions calculated at the relevant pH value. Table 2 displays the dissociation constants (K_D) obtained by SPR biosensor experiments, together with the results of the affinity scoring at both pH values calculated from eq 1. The energy values in this table were the result of an average over the 100 conformations with the lowest scoring function values. Including all conformations from the MD production trajectory did not change any of the binding trends calculated as indicated before (results not shown). Values in parentheses refer to the weighted scoring function, when the fraction of the protonated state for this residue is very close to 0.5.

Table 2 enables us to compare the calculated binding ranking of the inhibitors with the experimental one. As seen from this table, our scoring function reproduces the ranking of binding for every inhibitor upon a pH increase. For instance, our calculations show that the ligands that contain an isostere with a

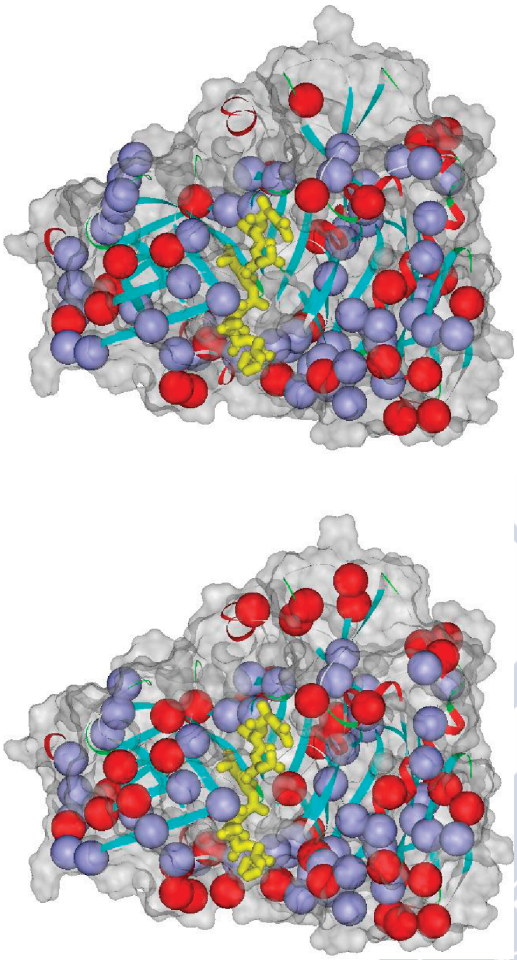


FIGURE 3: Charged residues as a function of pH value calculated for the **1FKN** complex. The upper panel corresponds to pH 4.5 and the lower panel to pH 7.4. Acidic residues are depicted as red and basic residues as blue spheres. The inhibitor is drawn in yellow sticks. The complex is represented by its water-accessible surface (shown in gray).

Table 3: pK_a Values for Buried Residues

	PDB code				
residue[a]	**1FKN**	**1M4H**	**2B8L**	**2IRZ**	**2VNN**[b]
Asp 32	10.46	10.35	8.35	6.88	8.67
Asp 83	4.49	4.74	4.79	4.87	4.83
Asp 138	2.98	3.11	3.23	3.38	3.41
Asp 228	7.26	7.68	4.47	4.01	4.11
Asp 311	3.04	3.53	3.88	3.59	3.62
Asp 346	4.46	4.46	4.55	4.59	4.49
Asp 363	3.34	3.25	3.08	3.06	3.24
Glu 116	5.66	6.07	5.95	6.09	5.80
Glu 200	5.95	5.63	5.50	5.52	5.43
Glu 207	4.79	4.67	5.02	5.02	4.60
Glu 219	4.40	4.38	4.06	4.61	4.57
Glu 339	6.72	6.73	6.10	6.26	6.44

[a]The pK_a values for Asp and Glu residues in solution are 3.9 and 4.2, respectively. [b]**2VNN** analogue.

hydroethylene motif are predicted to have their highest affinity for the protein at the pH value at which the enzyme has the highest catalytic activity (4.5), in agreement with the observed affinities. This trend stands to reason since the isosteres in these inhibitors (**OM99-2** and **OM00-3**) are transition state analogues and their ligand binding affinity ranking upon pH change should mimic that of the pH dependence of substrate binding (*34*). When the anchoring motif to the Asp dyad is an amino group, this trend inverts, and the highest affinity is observed at pH 7.4, also in agreement with experiment. The rationale behind this behavior could be possibly found in the charged nature of the amino group. As pointed out above (see section 2a), this group has a pK_a value around 10 in solution and would likely remain protonated inside the protein and induce the ionization of the Asp dyad, resulting in the formation of a salt bridge between both charged groups and hence raising the affinity of the ligand for the protein at this pH value. The K_D values obtained from SPR biosensor experiments indicate that those inhibitors with a mixed isostere's anchoring motif (i.e., those with a hydroxylethylamine motif) have a mixed behavior regarding the optimal pH for inhibitor binding to the protein, a trend that is predicted by our scoring function calculations as well. As can be seen from Table 2 compound **I-5** shows almost equal K_D at both pH values, while compound **I-3** has a higher affinity for the enzyme at higher pH. In the case of the **2B8L** complex, the resulting binding affinity pH dependence could be traced back at least in part to the Asp dyad possible multiple protonation state. While the Asp32 has a predicted pK_a value of 8.4 and hence will remain protonated at both pH values, the other member of the Asp dyad (Asp228) has a pK_a value only slightly lower than 4.5 (see Table 3), which will result in an almost equal population of charged and uncharged species at the lower pH. In this case we have performed a weighted binding affinity prediction as described in our Materials and Methods section. As seen from Table 2, the results agree slightly better with the K_D trend, when we average the binding affinities for the enzyme in both Asp228 protonation states, using as weights the fraction of protonation state of the Asp228 in both protonated states.

Furthermore, the affinity rankings for all of these inhibitors (with the exception of **I-5**) are well reproduced at low pH by our scoring function, in spite of its simplicity and absence of any adjustable parameters. For instance, our scoring function predicts that the transition state analogue inhibitors (e.g., **OM99-2** and **OM00-3**) are more potent than the HEA or amino-containing inhibitors at low pH, in agreement with the experimental K_D values. Although the slow dissociation of compounds **I-1** and **I-2** prevented the affinities to be estimated by the biosensor-based interaction experiments, FRET-based inhibition assays using the ectodomain region of BACE-1 indicate that the latter inhibitor is more potent than the former (data not shown), in agreement with our scoring function predictions (*20*). Our scoring function does not reproduce the experimental affinity trends as well amongst inhibitors at the higher pH values or across pH values.

(*4*) *Correlation between Binding Affinities at Acidic and Neutral pH with Cell Activity*. Since aspartic proteases generally present their highest activity at acidic pH values, it is believed that they act in cell compartments where the pH is low. Nevertheless, BACE-1 is found at the cell surface where pH is neutral. Furthermore, it was found recently that some BACE-1 inhibitors based on aminoheterocyclic fragments have a cell readout activity in the low micromolar range and an enzyme affinity in the same range at pH close to neutral (6.5) (*35*). As seen

from Table 2, the cell assays performed in our laboratory indicate that those inhibitors that have a high enzyme affinity at both high and low pH values (i.e., those inhibitors with a HEA moiety) also show high activity at the cellular level. A possible explanation for these results is that although BACE-1 is catalytically active once transported to endosomal vesicles where the pH is acidic, only compounds that also interact with the enzyme at neutral pH will be cotransported with the enzyme into this compartment. Hence, compounds that bind BACE-1 well at acidic as well as neutral pH values could in principle be good candidates for optimal performance at the cellular level, a design avenue for cell active compounds which we are going to explore for a larger number of compounds. The results presented here indicate that our computer-assisted protocols for the evaluation of the pH dependence could be ideally suited to assist in the design of cell active analogues.

In conclusion, we have studied the effect of pH on the binding affinities of a group of BACE inhibitors with a variety of chemical motifs by SPR. The seemingly incongruous experimental pH effect on the binding affinities was explained with the help of molecular mechanics-based calculations. The synergy between both approaches provides a number of interesting insights into the molecular recognition processes at a molecular level that underlie the observed binding affinities at different pH values. To the best of our knowledge the important issue of the dependence of ligand affinity on the ionization states of the protein residues and the ligand has only been sparingly addressed in the literature (*36*).

Our calculations reproduce the entire observed affinity ranking upon pH increase and most of the binding trends among inhibitors at low pH values. The agreement between the observed and calculated binding ranking lends support for the pK_a assignments afforded by the simple protocol used here, indicating that pK_a calculations by an approximation to the Poisson−Boltzmann approach have come a long way (*19*) and their outcome may rival that of more sophisticated protocols.

The binding pH dependence could be traced back to the protonation state of the titratable residues in the pH range studied. The results indicate that the pK_a values of the protein titratable residues, especially those that are close to the inhibitor, depend strongly on the nature of the ligand involved, in disagreement with earlier work (*14*, *15*). Perusal of the predicted Asp dyad protonation states underscores the pK_a dependence on the inhibitor's chemical nature. Our calculations indicate that inhibitors with the HE isostere motif (i.e., **OM99-2** and **OM00-3**) induce a diprotonated state at low pH (4.5), while the probability of a monoprotonated Asp dyad increases at higher pH (i.e., 7.4). Other isosteres, which include an amino group as its binding motif to the Asp dyad, lower the Asp dyad pK_a values (see Figure 2 and Table 3), generating monoprotonated and fully ionized Asp dyad states at both pH values. In a few cases, the Asp dyad can be populated by two alternative protonation states that could be taken into account in order to get a result that is more in line with the observed binding affinities.

Our results suggest that it might not be advisible to perform an *in silico* HTS search of fragments or BACE-1 putative ligands with one single protonation state across the board, as done previously by several research groups (*14*, *15*). More likely, the ligands would have to be classified in accordance with the protonation state they can elicit from the Asp dyad, and then the HTS screening could proceed with several enzyme targets differing in their protonation states.

As pointed out above, the pH values of the medium surrounding BACE-1 vary with the cell compartments where the enzyme is located. Nevertheless, we have shown in this work that the inhibitor activity at cell level may be related to high inhibitory potency at both acidic and neutral pH values. Computer-aided design based on the protocols introduced in this work could be very valuable in the search of inhibitors that exhibit this trait.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Eva Muñoz for helpful discussions.

REFERENCES

1. Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature 399*, A23–A31.
2. Villaverde, M. C., González-Louro, L., and Sussman, F. (2007) The search for drug leads targeted to the β-secretase: an example of the roles of computer assisted approaches in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem. 7*, 980–990.
3. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) Human aspartic protease mepapsin 2 cleaves the β-secretase site of β-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97*, 1456–1460.
4. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Khan, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.-C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) β-Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmebrane aspartic protease BACE. *Science 286*, 735–741.
5. Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashler, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β-secretase activity. *Nature 402*, 533–537.
6. Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., and John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β-secretase from human brain. *Nature 402*, 537–540.
7. Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β-secretase. *Mol. Cell Neurosci. 14*, 419–427.
8. Ghosh, A. K. (2009) Harnessing nature's insight: design of aspartyl protease inhibitors from treatment of drug-resistant HIV to Alzheimer's disease. *J. Med. Chem. 52*, 2163–2176.
9. Hanessian, S., Yun, H., Hou, Y., Yang, G., Bayrakdarian, M., Therrien, E., Moitessier, N., Roggo, S., Veenstra, S., Tintelnot-Blomley, M., Rondeau, J.-M., Ostermeier, C., Strauss, A., Ramage, P., Paganetti, P., Neumann, U., and Betschart, C. (2005) Structure-based design, synthesis, and memapsin 2 (BACE) inhibitory activity of carbocyclic and heterocyclic peptidomimetics. *J. Med. Chem. 48*, 5175–5190.
10. Coburn, C. A., Stachel, S. J., Li, Y.-M., Rush, D. M., Steele, T. G., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Xu, M., Huang, Q., Lai, M.-T., DiMuzio, J., Crouthamel, M.-C., Shi, X.-P., Sardana, V., Chen, Z., Munshi, S., Kuo, L., Makara, G. M., Annis, D. A., Tadikonda, P. K., Nash, H. M., Vacca, J. P., and Wang, T. (2004) Identification of a small molecule nonpeptide active site β-secretase inhibitor that displays nontraditional binding mode for aspartyl proteases. *J. Med. Chem. 47*, 6117–6119.
11. Jhoti, H., Cleasby, A., Verdonk, M., and Williams, G. (2007) Fragment-based screening using X-ray crystallography and NMR spectroscophy. *Curr. Opin. Chem. Biol. 11*, 485–493.
12. Murray, C. W., Callaghan, O., Chessari, G., Cleasby, A., Congreve, M., Frederickson, M., Hartshorn, M. J., McMenamin, R., Patel, S., and Wallis, N. (2007) Application of fragment screening by X-ray crystallography to β-secretase. *J. Med. Chem. 50*, 1116–1123.
13. Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C., and Tang, J. (2000) Structure of the protease domain of memapsin 2 (β-secretase) complexed with inhibitor. *Science 290*, 150–153.

14. Huang, D., Lüthi, U., Kolb, P., Cecchini, M., Barberis, A., and Caflisch, A. (2006) In silico discovery of β-secretase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc. 128*, 5436–5443.
15. Polgár, T., and Keserü, G. M. (2005) Virtual screening for β-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228. *J. Med. Chem. 48*, 3749–3755.
16. Park, H., and Lee, S. (2003) Determination of the active site protonation state of β-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design. *J. Am. Chem. Soc. 125*, 16416–16422.
17. Rajamani, R., and Reynolds, C. H. (2004) Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β-secretase. *J. Med. Chem. 47*, 5159–5166.
18. Yu, N., Hayik, S. A., Wang, B., Liao, N., Reynolds, C. H., and Merz, K. M., Jr (2006) Assigning the protonation states of key aspartates in β-secretase using QM/MM X-ray structure refinement. *J. Chem. Theory Comput. 2*, 1057–1069.
19. Spassov, V. Z., and Yan, L. (2008) A fast and accurate computational approach to protein ionization. *Protein Sci. 17*, 1955–1970.
20. Hong, L., Turner, R. T., III, Koelsch, G., Shin, D., Ghosh, A. K., and Tang, J. (2002) Crystal structure of mempasin 2 (β-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochemistry 41*, 10963–10967 Details of the synthesis of inhibitor OM00-3 are to be found in the Ph.D. Thesis of José Manuel Otero Casas (2007) Universidad de Santiago de Compostela (Spain).
21. Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Gregro, A. R., Rajapakse, H. A., Lai, M.-T., Crouthamel, M.-C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J. E., Pietrak, B. L., Espeseth, A. S., Shi, X.-P., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Munshi, S., Simon, A. J., Kuo, L., and Vacca, J. P. (2004) Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human β-secretase (BACE-1). *J. Med. Chem. 47*, 6447–6450.
22. Rajapakse, H. A., Nantermet, P. G., Selnick, H. G., Munshi, S., McGaughey, G. B., Lindsley, S. R., Young, M. B., Lai, M.-T., Espeseth, A. S., Shi, X.-P., Colussi, D., Pietrak, B., Crouthamel, M.-C., Tugusheva, K., Huang, Q., Xu, M., Simon, A. J., Kuo, L., Hazuda, D. J., Graham, S., and Vacca, J. P. (2006) Discovery of oxadiazoyl tertiary carbinamine inhibitors of β-secretase (BACE-1). *J. Med. Chem. 49*, 7270–7273.
23. Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., East, P., Hawkins, J., Howes, C., Hussain, I., Jeffrey, P., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., and Wayne, G. (2008) Second generation of hidroxyethylamine BACE-1 inhibitors: optimizing potency and oral bioavailability. *J. Med. Chem. 51*, 3313–3317.
24. Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Kulkarni, S., Xu, X., Miller, H. B., Reddy, D. S., Weerasena, V., Turner, R., Chang, W., Koelsch, G., and Tang, J. (2008) Potent memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: design, synthesis, protein-ligand X-ray structure, and in vivo evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 18*, 1031–1036.
25. Back, M., Nyhlén, J., Kvarnström, I., Appelgren, S., Borkakoti, N., Jansson, K., Lindberg, J., Nyström, S., Hallberg, A., Rosenquist, S., and Samuelsson, B. (2008) Design, synthesis and SAR of potent statine-based BACE-1 inhibitors: exploration of P1 phenoxy and benzyloxy residues. *Bioorg. Med. Chem. 16*, 9471–9486.
26. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature 360*, 672–674.
27. Discovery Studio, version 2.1, Accelrys Inc., San Diego, CA.
28. Momany, F. A., Klimkowski, V. J., and Schäfer, L. (1990) On the use of conformationally dependent geometry trends from *ab initio* dipeptide studies to refine potentials for the empirical force field CHARMM. *J. Comput. Chem. 11*, 654–662.
29. Im, W., Lee, M. S., and Brooks, C. L., III (2003) Generalized Born model with a simple smoothing function. *J. Comput. Chem. 24*, 1691–1702.
30. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem. 4*, 187–217.
31. Trylska, J., Antosiewicz, J., Geller, M., Hodge, C. N., Klabe, R. M., Head, M. S., and Gilson, M. K. (1999) Thermodynamic linkage between the binding of protons and inhibitors to HIV-1 protease. *Protein Sci. 8*, 180–195.
32. Piana, S., Sebastiani, D., Carloni, P., and Parrinello, M. (2001) Ab initio molecular dynamics-based assignment of the protonation state of pepstatin A/HIV-1 protease cleavage site. *J. Am. Chem. Soc. 123*, 8730–8737.
33. Coates, L., Tuan, H.-F., Tomanicek, S., Kovalevsky, A., Mustyakimov, M., Erskine, P., and Cooper, J. (2008) The catalytic mechanism of an aspartic protease explored with neutron and X-ray diffraction. *J. Am. Chem. Soc. 130*, 7235–7237.
34. Turner, R. T., III, Koelsch, G., Hong, L., Castanheira, P., Ghosh, A., and Tang, J. (2001) Subsite specificity of memapsin 2 (β-secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry 40*, 10001–10006.
35. Stachel, S. J., Coburn, C. A., Rush, D., Jones, K. L. G., Zhu, H., Rajapakse, H., Graham, S. L., Simon, A., Holloway, M. K., Allison, T. J., Munshi, S. K., Espeseth, A. S., Zuck, P., Colussi, D., Wolfe, A., Pietrak, B. L., Lai, M.-T., and Vacca, J. P. (2009) Discovery of aminoheterocycles as a novel β-secretase inhibitor class: pH dependence on binding activity part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 19*, 2977–2980.
36. Fornabaio, M., Cozzini, P., Mozzarelli, A., Abraham, D. J., and Kellogg, G. E. (2003) Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 2. Computational titration and pH effects in molecular models of neuraminidase-inhibitor complexes. *J. Med. Chem. 46*, 4487–4500.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Journal of Medicinal Chemistry

BRIEF ARTICLE

pubs.acs.org/jmc

On a Possible Neutral Charge State for the Catalytic Dyad in β-Secretase When Bound to Hydroxyethylene Transition State Analogue Inhibitors†

Fredy Sussman,*[,‡] José M. Otero,[§] M. Carmen Villaverde,[‡] Marian Castro,[∥] José L. Domínguez,[‡] Lucía González-Louro,[‡,§] Ramón J. Estévez,[§] and J. Carlos Estévez*[,§]

[‡]Molecular Modeling Research Group, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[§]Carbohydrate Research Group, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[∥]Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacia Industrial, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: β-Secretase is one of the aspartic proteases involved in the formation of amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. Our previous results using a combination of surface plasmon resonance experiments with molecular modeling calculations suggested that the Asp dyad in β-secretase bound to hydroxylethylene containing inhibitors adopts a neutral charged state. In this work, we show that the Asp dyad diprotonated state reproduced the binding ranking of a set of these inhibitors better than alternative protonation states.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a widespread, neurodegenerative, dementia-inducing disorder, characterized by the formation of amyloid plaques in the brain.[1] The genesis of this construct is catalyzed by a tandem of two proteases identified as β- and γ-secretases.[1,2] It is known that the former enzyme (also referred to as BACE-1 and Memapsin 2) participates in the rate-limiting step of the hydrolytic process that leads to the APP fragments,[1−3] a fact that has converted β-secretase into a major target for drugs against Alzheimer's disease.[2,4,5]

There are several issues related to the computer-aided design of novel ligands that could enhance the success of in silico high throughput screening protocols but that have not been fully addressed yet. One of the most vital ones is the protonation state of the many buried acidic residues found in this protein, including the active site Asp dyad, which lends to this enzyme an optimal catalytic activity at low pH.[3]

There have been many attempts to predict the charged state of the active site Asp dyad by computational methods.[6−9] The results of those calculations support the hypothesis that the most favored Asp dyad charge state is the one that has only one of the Asp residues protonated. Nevertheless, quantum mechanical (QM) based calculations have left open the possibility that the Asp dyad might be neutral at the acidic optimal pH of the protein.[8]

Recently, we have determined the effect of the pH on the affinities of a set of inhibitors with a variety of chemical motifs to the ectodomain BACE-1 region by a surface plasmon resonance (SPR) biosensor based assay.[10] To understand the molecular interactions that underlie the diverse optimum pH for the binding of the various inhibitors as observed experimentally, we calculated the titration curves for a set of BACE-1 ligand complexes.[10] One of our most striking results of that work relates to the protonation state of peptidic inhibitors with hydroxylethylene (HE) based isosteres. For these inhibitors, our calculations predicted that the Asp dyad will be diprotonated at low pH, as opposed to all previous studies that pointed to a monoprotonated Asp dyad state.[10]

To further investigate this issue, in this work we have assembled a set of transition state analogue peptidic inhibitors with HE isosteres (see Table 1), some of which have been already synthesized and tested by other authors, while others have been produced and assayed by our group. Using molecular mechanics based protocols we show that the diprotonated state reproduced the binding ranking of our set of peptidic inhibitors better than the ones based on either of the monoprotoned Asp dyad bearing enzymes proposed by previous studies,[6−9] a result that provides further support to our enzyme's charge assignment when bound to this type of transition state analogue inhibitors. Finally, we discuss the proposed Asp dyad protonation state in relation to the possible existence of low barrier hydrogen bonds (LBHBs) in these systems.

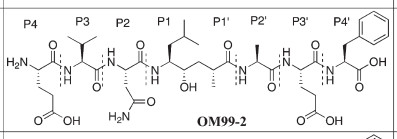
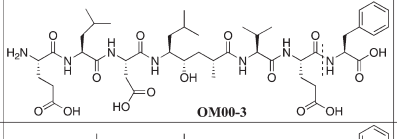
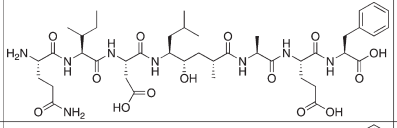
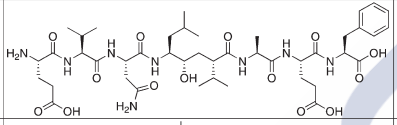
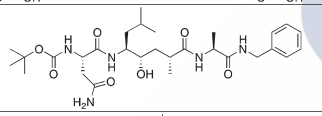
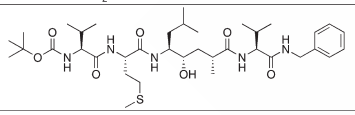
RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. The δ-amino acid isosters of inhibitors **3** and **4** were prepared as shown in Scheme 1, through a methodology that allows the introduction of a variety of side chain groups at P1/P1′ using as a key intermediate the oxiranelactone **9**, easily

Received: October 18, 2010
Published: March 31, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

Table 1. Inhibitors Studied in This Work and Their Experimental BACE-1 Inhibitory Activity

Name	Structure	Inhibitory activity
1	 OM99-2	IC_{50}= 19.11 nM[a] Ki = 1.6 nM[b]
2	 OM00-3	Ki = 0.3 nM[c]
3		IC_{50}= 45.5 nM[a]
4		IC_{50}= 164.5 nM[a]
5		Ki = 22,423.0 nM[b]
6		Ki = 2.5 nM[b]

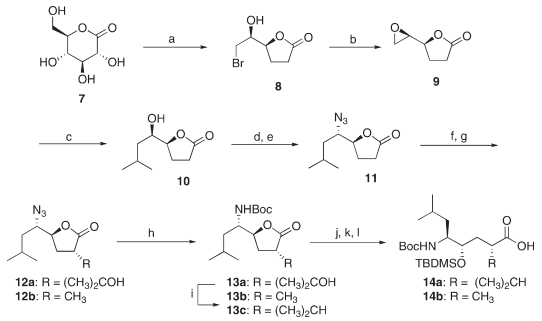
[a] See SI for details on IC_{50} evaluation. [b] Data from ref 17. [c] Data from ref 16.

prepared from D-glucono-1,5-lactone (7). Thus D-glucono-1,5-lactone (7) was transformed into lactone **8** by following a procedure described in the literature,[11] and this lactone, **8**, when treated in basic media with potassium carbonate in acetone, gave quantitatively the expected oxiranelactone **9**.

Key intermediate lactone **9** was first alkylated at C-6 when treated with isopropylmagnesium chloride to give compound **10** in 50% yield. The hydroxyl group in **10** was then transformed into the corresponding mesylate by treatment with methanesulfonyl chloride, followed by reaction with sodium azide to give azidolactone **11** in 89% yield. Alkylation of lactone **11** at C-2 position with LDA and subsequent addition of acetone afforded, in a 67% yield, compound **12a**, with all the functionality needed for the final isoster. To transform compound **12a** into the δ-amino acid isoster **14a**, compound **12a** was reduced at the azido position with hydrogen, using a mixture of palladium/carbon as catalyst, and the resulting amine treated in the reaction mixture with *tert*-butoxycarbonyl anhydride to give compound **13a** in 95% yield. Elimination of the alcohol group in **13a** when submitted to reaction with methyl chlorooxoacetate and triphenyltin hydride, using AIBN as starting radical reaction reactive, gave the expected compound **13c** in 70% yield. Finally compound **13c** was transformed into the isoster **14a** in a 76% yield by following a previously described procedure.[12]

The isoster **14b** was prepared by an easier version of the protocol that afforded compound **14a** because alkylation at position C-2 of the lactone can be done directly. Thus, the

Scheme 1. Total Synthesis of δ-Amino Acid Isosters 14a and 14b[a]



[a] Reagents and conditions: (a) as in ref 11; (b) K_2CO_3, acetone, rt, 20 h; (c) *i*PrMgCl, Li_2CuCl_4, THF, −78 °C, 30 min; (d) MsCl, pyridine, 0 °C, 5 h; (e) NaN_3, DMF, 80 °C, 12 h; (f) LDA, THF, −78 °C, 1 h; (g) acetone for **12a** and MeI for **12b**; (h) H_2 (1 atm), Pd−C (10%), $(Boc)_2O$, AcOEt, rt, 5 h; (i) $ClCOCO_2Me$, DMAP, Et_3N, THF, 0 °C, 1 h and then HPh_3Sn, AIBN, toluene, 110 °C, 3 h; (j) LiOH (1 M), DME, rt, 12 h; (k) ClTBDMS, imidazole, DMF, rt, 15 h; (l) MeOH, rt, 2 h.

intermediate lactone **11** was alkylated at C-2 position by treating it with LDA followed by methyl iodide to give **12b** in 70% yield. Azide **12b** was then reduced to amine with hydrogen, using palladium/carbon as catalyst, and the amine protected in the reaction medium with *tert*-butoxycarbonyl anhydride to give **13b** in 95% yield. Finally compound **13b** was transformed into the isoster **14b** in 82% yield following a described procedure.[12]

The above synthetic procedure for preparing the δ-amino acid isosters presents two advantages over previous approaches described in the literature. In the first place, the protocols presented here improve previous synthetic routes for the preparation of the oxirane intermediate **9** starting from a sugar.[13] Second, our synthetic strategy affords the insertion of any alkyl group at position C-5 in the lactone, a feature that will enable the synthesis of isosteres with a variety of side chain fragments beyond those that could be obtained from commercially available α-aminoacids.[14]

Binding Affinity Prediction. Table 1 lists the peptidic inhibitors studied here and their BACE-1 inhibitory activity expressed as IC_{50} and/or K_i values whenever available. This table also displays the partition into fragments for inhibitor **1** (OM99-2) following the rules of Schechter and Berger.[15] Having as a reference inhibitor **1**, compound **4** introduces an Ala → Val replacement in P1′. Studies on the substrate subsite specificity of BACE-1 by the group of J. Tang[16] indicate that the S1′ site is ill suited for bulky chains like those in Trp, Phe, or Val, the one that is found in the inhibitor **4**. Perusal of the IC_{50} values indicates that its presence increases the IC_{50} value (as compared to **1**) by 9-fold, in agreement with the predictions of the substrate fragment specificity.[16]

On the other hand, the ligand **3** introduces three aminoacid substitutions in the N-terminal segment of **1**: the Asn → Asp at P2, the Val → Ile at P3, and the Glu → Gln at P4. The substrate specificity studies predict that while Val → Ile replacement at P3 should increase the enzyme affinity, the Asn → Asp at P2 and the Glu → Gln at P4 modifications will decrease it.[16] In accordance with this line of thought, inhibitor **3** has a lower BACE-1 inhibitory activity (higher IC_{50} value) than **1**, indicating that the substitution at P3 does not compensate for the detrimental effect of the modifications at P2 and P4.

Finally, inhibitors **5** and **6** were originally the result of a second iteration drug design cycle aimed at reducing the size and molecular weight of BACE-1 inhibitors like **1** and **2** (OM00-3), based on the realization that in spite of the large size of this protein, the active site of BACE-1 is smaller than that of other aspartic protease enzymes.[17] While the parent compounds extended from fragment P4 to P4′, the analogues **5** and **6** cover a shorter span from either P4 to P3′ in **6**, or from P3 to P3′ in **5**. It was found that in agreement with the design premises, some of the shorter compounds were very potent BACE-1 inhibitors.[17]

As seen in Table 1, the experimental data obtained in this work using an in vitro peptide cleavage FRET assay, together with the data extracted from the literature,[16,17] point toward the following BACE-1 inhibitory activity:

$$\mathbf{2} > \mathbf{1} \sim \mathbf{6} > \mathbf{3} > \mathbf{4} > \mathbf{5}$$

One of the main aims of this work is to compare the ligand binding affinities generated by a diprotonated BACE-1 Asp dyad proposed in our recent work[10] with that of monoprotonated states proposed by other groups.[6−9] For this sake, we carried out a very careful and involved docking by homology, having as a template the X-ray structure of the complex between BACE-1 and inhibitor **1** (pdb code 1FKN).[18] Once the starting docked structures were obtained, we proceeded to calculate the pK_a values for all titratable residues by the protocol of Spassov and Yan[19] at pH 4.5, a value close to the optimal pH of the enzyme (see Supporting Information (SI) for details). These calculations produce titration curves that depict the degree of protonation for each ionogenic residue at every pH value. Our pK_a calculations indicate that the catalytic Asp dyad of all BACE-1/inhibitor complexes studied here will be neutral. To illustrate this issue, we display the titration curves for the Asp dyad residues (see Figure S1, SI) elicited by the presence of **1** and the shortest inhibitors **5** and **6**. As seen from this figure, both Asp residues have an almost constant protonation fraction close to 1, even at pH values around 7, indicating that the Asp dyad will remain neutral in the acidic medium optimum for the enzymatic activity. Moreover, the protonation fraction pH dependence graphs indicate that the Asp 32 has a higher pK_a value than Asp 228 and hence will remain protonated at higher pH.

To include the alternative monoprotonated states, we selected additional starting structures with single charged Asp dyads, predicted by previous studies.[7,8] To assess the effect of the monoprotonated Asp dyad on the charge state of the remainder titratable residues, we fixed the Asp dyad in a monoprotonated state (with the Asp 228 charged) and proceeded to recalculate the pK_a values of the remainder titratable residues, using the protocol described above, and in detail in the SI. The specific Asp dyad charge assignment for this calculation was based on the ionization proclivity (see Figure S1, SI). Our results indicate that the pK_a values of the other residues do not vary, implying that in this protocol the Asp dyad charge has a marginal effect on the titration of the other ionogenic residues (results not shown). The resulting structures with the protonation states that included monoprotonated and diprotonated catalytic dyads were used in our molecular mechanics (MM)/molecular dynamics (MD) protocol, aimed at generating binding poses for each protonation state. The final production stage of the MD protocol was used to calculate the binding affinity scoring function for each of the inhibitors listed in Table 1 (see SI for details).

Table 2 lists the binding scoring function values for the three Asp dyad protonation states studied here. The first column contains the scoring function values for the charge distributions calculated in this work, which include a neutral Asp dyad. The other columns list the scoring function for the enzyme with the Asp dyad in the monoprotonated states supported by previous calculations.[6−9] To assess the effect of the rest of the ionogenic residues, we carried out two simulations for the case where the Asp 32 is protonated. In the first one, we used the predicted pK_a values of the titratable residues other than the Asp dyad, and in the second one, we left those residues with their individual charge assignment in solution at pH 7.

Table 2. Binding Affinities Scoring Function Values Calculated for the Docked Poses with the Catalytic BACE-1 Asp Dyad in Three Different Protonation States[a]

inhibitor	AspH32/ AspH228[b]	AspH32/ Asp(−)228[b]	Asp(−)32/ AspH228[c]	AspH32/ Asp(−)228[c]
1 (OM99-2)	−95.5 ± 2.1	−89.2 ± 1.7	−91.8 ± 2.8	−80.9 ± 1.0
2 (OM00-3)	−99.1 ± 1.5	−91.6 ± 2.0	−84.8 ± 1.7	−77.7 ± 1.5
3	−95.7 ± 1.4	−98.0 ± 2.0	−90.1 ± 2.3	−98.4 ± 2.6
4	−95.2 ± 1.2	−97.0 ± 2.6	−101.9 ± 2.4	−93.9 ± 2.8
5	−75.0 ± 1.4	−76.6 ± 2.0	−76.8 ± 2.0	−77.0 ± 2.1
6	−96.2 ± 2.2	−94.6 ± 1.7	−95.7 ± 1.1	−91.4 ± 2.0

[a] Energies are in kcal/mol. [b] The ionizable residues charge states were calculated according to the protocol described in the SI. [c] The ionizable residues, other than those in the Asp dyad, were assigned following their pK_a values in solution at pH 7.

Perusal of Table 2 indicates that the predictions based on the Asp dyad for the two possible monoprotonated states are unsuccessful in correctly ranking these ligands. For instance, the ranking prediction based on the protonated Asp 228 points to **4** as the top binder, while **2** is estimated to be one of the worst, contrary to the experimental observations. The binding affinities calculated with protonated Asp 32, predict that **1** is one of the worst binders, while **4** one of the best, at variance with the experimental results, regardless of the charge state of the rest of the titrable residues. As seen from this table, only the calculations carried out with an Asp dyad in the doubly protonated state came closer to rank properly the inhibitors studied here. For instance, calculations carried with a neutral Asp dyad are the only ones to identify **2** as the inhibitor with the highest affinity and **4** as next to worst binder, in agreement with the experimental results (see Table 1).

All previous calculations started from the premise that the Asp dyad is monoprotonated, but they disagreed on which Asp residue the proton resides.[2] The earliest attempt to assign a charge to the catalytic dyad was based on MD simulations of the X-ray structure of the β-secretase complexed with inhibitor **1** in solution.[7] Their results indicate that a neutral Asp32 and ionized Asp228 combination is the only option that maintains the intricate network of hydrogen bonds around the Asp dyad observed in the X-ray structure.[7] This outcome is in agreement with our recent results[10] for the **1**/BACE-1 complex around a neutral pH, the one used for the determining its structure by X-ray crystallography.

Nevertheless, as pointed out above, our calculations suggest that the dyad is totally neutralized at the pH at which the FRET based enzyme inhibition assays have been carried out and at which the enzyme presents its highest activity (pH 4.5). Other calculations carried out on the **1**/BACE-1 complex, like the linear scaling quantum approach,[8] supported a monoprotonated state Asp dyad with a neutralized Asp 228 and a charged Asp 32, also in

disagreement with the conclusions based on our binding affinity predictions. Nevertheless, the authors of this QM study found out that a diprotonated state could be accessible at optimal enzyme pH given the rather small energy difference found with the monoprotonated state.[8] The only other study that evaluated the protonation state for the Asp dyad from the calculated titration curves is the one carried out by Polgar and Keserü.[6] From these curves, they surmised that the Asp dyad should be monoprotonated, with the proton located at Asp 32. Nevertheless, perusal of their titration curves indicate that the protonation fraction at pH 4.5 (close to the enzyme's optimal pH) is well above 0.5 for both Asp residues, indicating that the Asp dyad should be diprotonated at that relevant pH value.

There have been a large number of studies on the Asp dyad protonation state of other aspartic proteases. The results are not unambiguous, but they support the idea that the dyad charge will depend on the nature of the inhibitor and of the aspartic protease studied. For instance, NMR studies combined with Poisson−Boltzmann calculations carried out on the HIV-1 PR, an aspartic protease that is the target for many AIDS drugs, support the premise that there are some HIV-1 PR inhibitors (cyclic ureas) that elicit a diprotonated Asp dyad, while others, like KNI-272, produce a monoprotonated Asp dyad.[20] Our recent results performed on a chemically diverse set of BACE-1 inhibitors also support the ligand dependence of the Asp dyad protonation state.[10]

One of the most stringent experimental tests on the Asp dyad protonation state proposals will be a neutron diffraction structural determination for some of the BACE-1 inhibitor complexes studied here. Previously, neutron diffraction combined with X-ray studies in endothiapepsin (a fungal aspartic protease) bound to a gem-diol inhibitor implied the possible existence of low barrier hydrogen bonds (LBHB), characterized by short distances between one of the inhibitors hydroxyl groups and the oxygens of the Asp dyad (~2.50 Å).[21] There has been some debate about which kind of experimental observables or computed variables should be used to unambiguously identify a LBHB, and some authors have even disputed its very existence.[22] Nevertheless, the compact hydrogen bonds (HBs), which support the existence of LBHBs, have been observed in several X-ray structures of ligand bound aspartic proteases, besides endothiapepsin, like in HIV-1 PR[23] and BACE-1 bound to peptidic inhibitors,[18] suggesting that LBHBs may be a common feature for some aspartic protease−inhibitor complexes. It has been posited that in LBHBs, the proton that mediates the HB could undergo tunnelling, from the energy well located next to hydroxyl oxygen to the one next to the carboxylate oxygen.[21] In such a system, the proton could be found at both positions (see Figure 1B), resulting in the dispersion of the negative charge of the Asp residue. It may be argued that the tunneling in the LBHB populates the Asp dyad diprotonated state, and hence it may be claimed that among the three active site charge distributions studied here (two monopronated and one diprotonated states), the latter could be a compromise molecular mechanics representation of the entities implied by LBHB (Figure 1). The improved ranking provided by including a neutral Asp dyad over the alternative monoprotonated states (shown in this work) could be a result of a better representation of the LBHB in molecular mechanics simulations. There has been an increased body of work aimed at identifying and characterizing LBHBs in enzymes since they were proposed among others by the group of Frey.[24] In the case of aspartic proteases, quantum mechanical

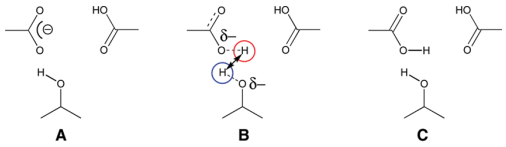


Figure 1. (A) and (C) represent two of the three possible protonation states (mono- and diprotonated) for the Asp dyad, while (B) schematically represents a LBHB, showing the possible proton positions enclosed by red and blue circles.

(QM) or quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM) studies have been applied to the unbound enzymes of this family[25] and enzymes bound to phosphinate and phosphanate containing inhibitors.[26] Nevertheless, no calculations of this kind have been applied to aspartic proteases bound to HE peptidomimetic transition state analogue inhibitors. At present, we are involved in the development of quantum mechanical protocols that would overcome some of the shortcomings of this kind of calculations, like the representation of the quantum region. The results of our QM calculations will be presented elsewhere.

CONCLUSIONS

To further validate the Asp dyad protonation state in BACE-1 bound to HE transition state analogues, found in our laboratory,[10] we have compared the binding ranking predictions for a set of HE peptidomimetic inhibitors based on alternative Asp dyad protonation states by a molecular mechanics method developed in our group. Some of the inhibitors studied were synthesized in our laboratory by a protocol that can afford many isostere variants at P1/P1′. Our calculations indicate that Asp dyad neutral state reproduces better the binding ranking that the Asp dyad charged alternatives. The results are discussed in the light of possible LBHB between the Asp dyad components and the HE isostere hydroxyl group.

EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis of Inhibitors. Inhibitors **4** and **3** were prepared from the corresponding δ-amino acids isosters **14a** and **14b** at the Serveis Cientificotècnics Universitat de Barcelona (Spain) by a Boc/Bzl strategy following standard protocols. The purity was greater than 95% as judged by HPLC. See SI for details.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Experimental procedures for the synthesis of isosters **14a** and **14b** and inhibitors **3** and **4** as well as IC_{50} evaluation. Detailed docking and affinity prediction protocols. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org..

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*For F.S.: phone, 34-881-814402; fax, 34-981-595012; E-mail, fredy.sussman@usc.es. For J.C.E.: phone, 34-881-815730; fax, 34-981-591014; E-mail, juancarlos.estevez@usc.es.

■ ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by financial aid from the Xunta de Galicia (to F.S. and grant PGIDIT 08CSA002209PR to M.C.V.) and Ministerio de Educación y Ciencia (grants CTQ2005-00555/BQU and CTQ2008-03105 to R.J.E. and fellowships to J.M.O. and J.L.D.). The Supercomputing Center of Galicia (CESGA) provided computer time.

DEDICATION

†Dedicated to the memory of Professor Rafael Suau, recently deceased.

■ ABBREVIATIONS USED

AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; BACE, β-site APP cleaving enzyme; QM, quantum mechanics; SPR, surface plasmon resonance; HE, hydroxyethylene; LBHB, low barrier hydrogen bond; FRET, fluorescence resonance energy transfer; MM, molecular mechanics; MD, molecular dynamics; HIV-1 PR, human immunodeficiency virus type 1 protease; HB, hydrogen bond

■ REFERENCES

(1) Selkoe, D. J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **1999**, *399*, A23–A31.

(2) Villaverde, M. C.; González-Louro, L.; Sussman, F. The Search for Drug Leads Targeted to the β-Secretase: An Example of the Roles of Computer Assisted Approaches in Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 980–990.

(3) Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S.; Downs, D.; Dashti, A.; Tang, J. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β-secretase site of β-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 1456–1460.

(4) Silvestri, R. Boom in the Development of Non-peptidic β-Secretase (BACE1) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 295–338.

(5) (a) Ghosh, A. K.; Gemma, S.; Tang, J. β-Secretase as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 399–408. (b) Ghosh, A. K. Harnessing Nature's Insight: Design of Aspartyl Protease Inhibitors from Treatment of Drug-Resistant HIV to Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2163–2176.

(6) Polgár, T.; Keserü, G. M. Virtual Screening for β-Secretase (BACE1) Inhibitors Reveals the Importance of Protonation States at Asp32 and Asp228. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3749–3755.

(7) Park, H.; Lee, S. Determination of the Active Site Protonation State of β-Secretase from Molecular Dynamics Simulation and Docking Experiment: Implications for Structure-Based Inhibitor Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16416–16422.

(8) Rajamani, R.; Reynolds, C. H. Modeling the Protonation States of the Catalytic Aspartates in β-Secretase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5159–5166.

(9) Yu, N.; Hayik, S. A.; Wang, B.; Liao, N.; Reynolds, C. H.; Merz, K. M., Jr. Assigning the Protonation States of Key Aspartates in β-Secretase Using QM/MM X-ray Structure Refinement. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1057–1069.

(10) Domínguez, J. L.; Christopeit, T.; Villaverde, M. C.; Gossas, T.; Otero, J. M.; Nyström, S.; Baraznenok, V.; Lindström, E.; Danielson, U. H.; Sussman, F. Effect of the Protonation State of the Titratable Residues on the Inhibitor Affinity to BACE-1. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7255–7263.

(11) (a) Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C. Preparation of some bromodeoxyaldonic acids. *Carbohydr. Res.* **1979**, *68*, 313–319. (b) Lundt, I.; Pedersen, C. Preparation of some 2,3-Dideoxylactones by an Unusual Catalytic Hydrogenolysis. *Synthesis* **1986**, 1052–1054.

(12) Ghosh, A. K.; Shin, D.; Downs, D.; Koelsch, G.; Lin, X.; Ermolieff, J.; Tang, J. Design of Potent Inhibitors for Human Brain Memapsin 2 (β-Secretase). *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3522–3523.

(13) Ghosh, A. K.; McKee, S. P.; Thomson, W. J. An Efficient Synthesis of Hydroxyethylene Dipeptide Isosteres: The Core Unit of Potent HIV-1 Protease Inhibitors. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6500–6503.

(14) (a) D'Aniello, F.; Taddei, M. A Stereoselective Method for the Preparation of HIV-1 Protease Inhibitors Based on the Lewis Acid Mediated Reaction of Allylsilanes and *N*-Boc-α-amino Aldehydes. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5247–5250. (b) Ghosh, A. K.; Cappiello, J.; Shin, D. Ring-closing metathesis strategy to unsaturated γ- and δ-lactones: synthesis of hydroxyethylene isostere for protease inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4651–4654.

(15) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.

(16) Turner, R. T., III; Koelsch, G.; Hong, L.; Castenheira, P.; Ghosh, A.; Tang, J. Subsite Specificity of Memapsin 2 (β-Secretase): Implications for Inhibitor Design. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10001–10006.

(17) Ghosh, A. K.; Bilcer, G.; Harwood, C.; Kawahama, R.; Shin, D.; Hussain, K. A.; Hong, L.; Loy, J. A.; Nguyen, C.; Koelsch, G.; Ermolieff, J.; Tang, J. Structure-Based Design: Potent Inhibitors of Human Brain Memapsin 2 (β-Secretase). *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2865–2868.

(18) Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 (β-Secretase) Complexed with Inhibitor. *Science* **2000**, *290*, 150–153.

(19) Spassov, V. Z.; Yan, L. A fast and accurate computational approach to protein ionization. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1955–1970.

(20) Trylska, J.; Antosiewicz, J.; Geller, M.; Hodge, C. N.; Klabe, R. M.; Head, M. S.; Gilson, M. K. Thermodynamic linkage between the binding of protons and inhibitors to HIV-1 protease. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 180–195.

(21) Coates, L.; Tuan, H.-F.; Tomanicek, S.; Kovalevsky, A.; Mustyakimov, M.; Erskine, P.; Cooper, J. The Catalytic Mechanism of an Aspartic Proteinase Explored with Neutron and X-ray Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7235–7237.

(22) Schutz, C. N.; Warshel, A. The Low Barrier Hydrogen Bond (LBHB) Proposal Revisited: The Case of the Asp···His Pair in Serine Proteases. *Proteins* **2004**, *44*, 711–723.

(23) Jaskólski, M.; Tomaselli, A. G.; Sawyer, T. K.; Staples, D. G.; Heinrikson, R. L.; Schneider, J.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. Structure at 2.5 Å Resolution of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Complexed with a Hydroxyethylene-Based Inhibitor. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1600–1609.

(24) Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* **1994**, *264*, 1927–1930.

(25) Porter, M. A.; Molina, P. A. The Low-Barrier Double-Well Potential of the $O^{\delta 1}-H-O^{\delta 1}$ Hydrogen Bond in Unbound HIV Protease: A QM/MM Characterization. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1675–1684.

(26) Vidossich., P.; Carloni, P. Binding of Phosphinate and Phosphonate Inhibitors to Aspartic Proteases: A First-Principles Study *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1437–1442.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Author's personal copy

Bioorganic & Medicinal Chemistry 20 (2012) 4838–4847

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Experimental and 'in silico' analysis of the effect of pH on HIV-1 protease inhibitor affinity: Implications for the charge state of the protein ionogenic groups

José L. Domínguez [a], Thomas Gossas [b,†], M. Carmen Villaverde [a], U. Helena Danielson [b,*], Fredy Sussman [a,*]

[a] Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
[b] Department of Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 February 2012
Revised 21 May 2012
Accepted 25 May 2012
Available online 7 June 2012

Keywords:
pH effect
Ligand binding affinity
HIV-1 PR
Surface plasmon resonance
Molecular mechanics
Ionizable residues
Protonation states
Asp catalytic dyad

ABSTRACT

The pH dependence of the HIV-1 protease inhibitor affinity was studied by determining the interaction kinetics of a series of inhibitors at three pH values by surface plasmon resonance (SPR) biosensor analysis. The results were rationalized by molecular mechanics based protocols that have as a starting point the structures of the HIV-1 protease inhibitor complexes differing in the protonation states as predicted by our calculations. The SPR experiments indicate a variety of binding affinity pH dependencies which are rather well reproduced by our simulations. Moreover, our calculations are able to pinpoint the possible changes in the charged state of the protein binding site and of the inhibitor that underlie the observed effects of the pH on binding affinity. The combination of SPR and molecular mechanics calculations has afforded novel insights into the pH dependence of inhibitor interactions with their target. This work raises the possibility of designing inhibitors with different pH binding affinity profiles to the ones described here.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The affinity of a ligand for a protein is dependent on environmental conditions, such as ionic concentration and pH, which influence inhibitor protein interactions not only on a biochemical, but also at a cellular level.[1] For this reason, the dependence of inhibitor binding on pH could have important implications for drug discovery. To study this issue, we use the protease of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1 PR), as a benchmark. This enzyme is a very successful AIDS therapeutic target, because its inhibition precludes the proteolytic cleavage of viral protein precursors into functional units, and hence viral replication. In the process, the HIV-1 PR has turned into the most studied member of the aspartic protease family.[2,3]

Usually, the inhibitor binding affinity to HIV-1 PR is determined in assays performed at the optimum enzymatic pH (ca. 5.5), where the enzyme is catalytically active. However, it is possible that HIV-1 PR inhibitors may bind also at physiological pH if they are to be useful as drugs, as has been suggested for BACE-1 inhibitors.[1] In fact many HIV-1 PR inhibitors are less active in cell and animal assays than in the low pH tests used to screen the leads. Nevertheless, there are very few studies dealing with the pH dependence of the binding affinity.[4–6] The emergence of surface plasmon resonance (SPR) has open new venues for this endeavor since it avoids the ambiguities and problems of the FRET based techniques,[1,7,8] precluding the need for a protocol based on a competitive regime with a substrate, whose binding and catalysis may be pH dependent. Members of our group have already used SPR techniques to study different aspects of inhibitor binding to HIV-1 PR. In this line of work we found that interaction kinetics rate constants rather than inhibition constants can help explain structure activity relationships,[8] and that the inhibitor optimization can be guided by the search of inhibitors with a high association and low dissociation constants.[9]

Abbreviations: HIV-1 PR, human immunodeficiency virus type 1 protease; BACE, β-site APP cleaving enzyme; FRET, fluorescence resonance energy transfer; SPR, surface plasmon resonance; NMR, nuclear magnetic resonance; RU, resonance units; DS, discovery studio; CPIRpK_a, calculation of protein ionization and residue pK_a; DC, dielectric constant; EM, energy minimization; NOE, nuclear Overhauser effect; CHARMM, chemistry at Harvard molecular mechanics; ABNR, adopted basis set Newton Raphson; GBSW, generalized Born with simple switching; LBHB, low barrier hydrogen bond; HB, hydrogen bond.

* Corresponding authors. Tel.: +34 8818 14402.
E-mail addresses: helena.danielson@biorg.uu.se (U. Helena Danielson), fredy.sussman@usc.es (F. Sussman).
† Present address: Beactica AB, Uppsala, Sweden.

0968-0896/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.070

Author's personal copy

The changes in binding affinity upon a pH change can be traced back to variations in protonation states of the ionogenic groups in the protein residues and inhibitors.

The many studies that have dealt with the protonation state of HIV-1 PR have centered primarily on the Asp dyad (AspA25/AspB25), the catalytic machinery of the enzyme.[4–6,10–12] Some of the studies rely on the pD dependence of the NMR chemical shift of the carboxyl carbons and/or H/D isotope effect upon the Asp carboxyl carbon chemical shift, like the ones used to study the complexes with ligands (KNI-272 and DMP323).[10,11] Recently, high resolution X-ray and neutron diffraction studies on the HIV-1 PR—KNI-272 complex[12] suggest that the dyad is monoprotonated at pH 5.5, in contrast to the diprotonated state predicted by ab-initio quantum molecular dynamics calculations performed earlier on the HIV-1 PR-pepstatin complex.[13] Other studies base their results either partially or totally on molecular mechanics or Poisson Boltzmann calculations.[6]

In this work we address the question of the pH dependence of the binding affinity by evaluating the change in kinetic rate constants (k_{on} and k_{off}) and the dissociation constant K_D, for a group of HIV-1 PR inhibitors of diverse chemical structure, by SPR experiments at three different pH values. The results are rationalized by molecular mechanics calculations that have as a starting point HIV-1 PR structures with the protonation states predicted by a Born approach to the Poisson Boltzmann equation in a molecular mechanics framework. Our results indicate upward pK_a shifts in the Asp dyad values upon binding, a result that was rationalized by the way in which the molecular mechanics calculations represent the existence of low barrier hydrogen bonds between the inhibitor and one of the carboxylate side chains belonging to the Asp dyad.

Our calculations reproduce rather well the binding affinity ranking due to a pH increase and provide a rationale for the experimental results based on the pK_a values of the ionizable groups of the protein and the inhibitor. Furthermore, we predict that the replacement of single atoms or groups of atoms in the inhibitors studied here could lead to ligands with new binding affinity pH dependent profiles.

2. Methods

2.1. SPR biosensor interaction analysis

In order to examine the effect of the pH on the binding affinity we have determined the affinities of a variety of inhibitors at three pH values (4.1, 5.1 and 7.4). An SPR-biosensor instrument (Biacore S51, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used for the interaction studies. All experiments were carried out at 25 °C and immobilization was performed at a flow rate of 5 μl/min. HIV-1 protease was covalently attached to the carboxymethylated dextran matrix of a CM5 sensor chip (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) via primary amines on the protein using standard amine coupling method. A fresh mixture of 0.2 M *N*-ethyl-*N*′-[(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) was injected for 7 min to activate the carboxyl groups of the dextran matrix. HIV-1 protease (~0.3 mg ml^{-1} in 5 mM maleic acid, pH 6.0) was then injected until sufficient amounts of protein were immobilized (1–2 min). Directly following immobilization, EDC/NHS was again injected for 7 min to stabilize the sensor surface.[14] Ten micromolar Hepes, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P-20 (polyoxyethylene sorbatan; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used as running buffer during the immobilization procedure. The same buffer with addition of 3% DMSO was also used for the interaction studies at pH 7.4. Interaction experiments at acidic pH used acetic acid buffers (10 mM acetic acid, 0.15 M NaCl, at pH 5.1 or 4.1) with addition of 3% DMSO and 0.005% surfactant P-20.

Interaction studies were performed with 3.7–300 nM nelfinavir and 1.2–100 nM saquinavir (generous gifts from Medivir AB, Huddinge, Sweden). Indinavir (Merck Sharp & Dohme Ltd Herts, UK) was used as positive control at 90 nM, to monitor surface activity. The inhibitors were injected in running buffer for 60–120 s at a continuous flow of 90 μl min^{-1}. Dissociation was monitored for 600 s. The sensor surface was regenerated by an injection of 10 μl 1 M LiCl, 50% ethylene glycol at the end of each cycle. Three blank samples were also injected before, in the middle and after each concentration series. A standard solvent correction procedure according to the Biacore S51 methodology handbook (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was included for every experiment.

2.2. SPR interaction data analysis

Binding responses were recorded in resonance units (RU) and presented graphically as a function of time in sensorgrams. Biacore S51 and BIAevaluation software (version 3.0.2, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used to extract information from the sensorgrams. By subtracting the response from a reference flow cell, and including the solvent correction procedure, signals could be corrected for differences in bulk refractive index and nonspecific binding. An average response of the three blank injections was also subtracted from the sensorgram in order to correct for small systematic distortions arising from differences between the enzyme and the reference surfaces. A 1:1 Langmuir interaction model accounting for limited mass transport[15] was globally fitted to corrected sensorgrams of a series of six different inhibitor concentrations.

2.3. Structure preparation for modeling

The inhibitors studied in this work are listed in Figure 1. They include a variety of chemical motifs that range from those peptidic inhibitors that emerged early in the search for drug leads like Ac-pepstatin up to those that are currently being used clinically in the treatment of AIDS like saquinavir, nelfinavir and indinavir. The relevant pdb entries (1EBW, 1EBY,[16] 5HVP,[17] 1SDV,[18] 2NMW[19] and 3EKX) were downloaded, all hydrogens added and the CHARMM force field[20] atom types and charges assigned. The structure of the complex between HIV-1 PR and inhibitor A008 is not known. We were able to build it from the pdb entry 1AJX by replacing the benzyl groups by 4-hydroxymethylbenzyl moieties and orienting the side chains to avoid strong steric clashes.

2.4. pK_a calculations

The pK_a values for all titratable residues were calculated by the protocol proposed by Spassov and Yan,[21] implemented in Discovery Studio[22] and named calculation of protein ionization and residue pK_a (CPIRpK_a). This protocol, which employs a generalized Born approximation to reproduce solvent effects, allows for the iterative determination of the pK_a of interacting residues. The internal and external dielectric constants (DC) used in these calculations were 10 and 80, respectively, the ionic strength 0.145, and the energy cutoff for clustering was 0.5 kcal/mol. The protocol used here for the prediction of the pK_a value of ionizable residues, applies to all residues of the protein and to the amino acids that form part of the inhibitor. Therefore, this algorithm was able to predict the pK_a values (and the protonation fraction at a given pH) for the acidic amino acids in proteins and for the acidic residues in those inhibitors that have peptidic fragments. Whenever the inhibitors contained ionogenic groups (like the amino groups in nelfinavir, indinavir and saquinavir, or the statin moiety carboxylate group in Ac-pepstatin), the pK_a values were evaluated for both charge states of the inhibitor.

Author's personal copy

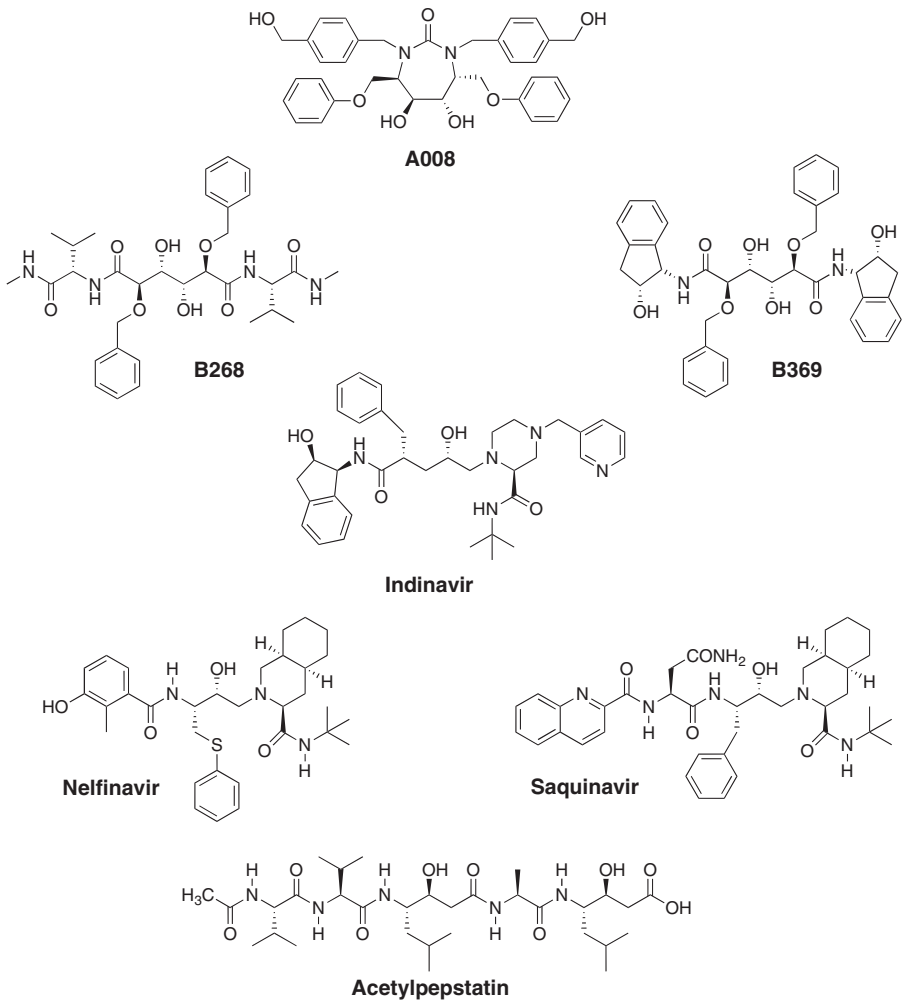


Figure 1. Inhibitors studied in this work.

Since the module CPIRpK_a does not evaluate the pK_a values of the inhibitors ionogenic groups, we have used the pK_a values calculated in solution by the Epik module[23] implemented in the Schrödinger suite of programs.[24]

2.5. Affinity predictions

For our affinity calculations we chose the protonation states predicted as the prevalent ones at pH 4.1, 5.1 and 7.4 on the basis of the calculated protonation fraction for each residue by the pK_a predictor DS module. Whenever the pH fell very close to the pK_a value of a HIV-1 PR acidic residue, additional structures with the alternative protonation states are needed in order to evaluate our scoring function (see below). Given the large number of initial structures to study, we choose a simplified method for treating them, based on a multi-step molecular mechanics energy minimization (EM) protocol. The first part incorporated two EM protocols devoted to optimize the proton position and the hydrogen bond ligand–protein network observed in the crystallographic structure. In the first EM we fixed all heavy atoms, while in the second we placed NOE constraints on the heavy atoms that participate as donors and acceptors in hydrogen bonds between the ligand and the protein. Each of the EM had two segments: the first one was an EM steepest descent segment of 2000 steps, and the second one a stage of 50,000 steps with an ABNR optimization protocol. The tolerance gradient in all these calculations was 0.001 kcal/mol Å^2. For all the EM calculations we used an implicit solvation term based on the generalized Born approach with simple switching (GBSW),[25] with protein dielectric constant of 5. This value was chosen to take into account implicitly the protein flexibility.[6]

For each of the optimized structures we obtained the binding affinity scoring function using the following expression:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{mm}}(\text{P:L}) - \Delta G_{\text{mm}}(\text{P}) - \Delta G_{\text{mm}}(\text{L}) + \Delta G_{\text{gb}}(\text{P:L}) - \Delta G_{\text{gb}}(\text{P}) - \Delta G_{\text{gb}}(\text{L}) \quad (1)$$

where ΔG_{mm} and ΔG_{gb} indicate the molecular mechanics CHARMM force-field[20] and the GBSW solvation[25] components, respectively, for the protein–ligand complex (P:L), protein (P) and ligand (L).

All the EM and analysis calculations were performed with the CHARMM suite of programs[26] in the 2400 processors Finisterrae supercomputer facility available at the supercomputing center of Galicia (CESGA).

As mentioned above, there exists the possibility that for a given acidic residue, both the charged and neutral protonation states would be highly populated. In that case, the final binding scoring

Author's personal copy

function was obtained through a weighted binding scoring function for both protonation states.

$$\Delta G_{bind} = X_1 \Delta G_{bind}(0) + (1 - X_1)\Delta G_{bind}(-1) \quad (2)$$

Where $\Delta G_{bind}(0)$ and $\Delta G_{bind}(-1)$ are the scoring function values when an acidic residue is protonated or charged, respectively. X_1 is the protonation fraction for a specific residue, obtained from its pK_a value through the Henderson-Hasselbalch equation for a given pH.

2.6. Effect of the dielectric constant on binding affinities

It is known that the dielectric constant has a strong effect on the calculated pK_a values of the ionogenic groups.[6] In order to evaluate the effect of this parameter on our results, we re-evaluated the pK_a values of the titratable residues for some of the complexes studied at various dielectric constants ranging from the default value of 10 up to a final value of 20. As before, once the charge states of these complexes were estimated (see Section 2.4), the binding affinities for the complexes studied were obtained using the protocols described in Section 2.5 with the new higher value of DC.

3. Results

3.1. Kinetic analysis and pH dependencies of inhibitor interactions

The interaction kinetic parameters for saquinavir and nelfinavir were determined at three different pH values (4.1, 5.1 and 7.4) (see Table 1). The pH dependencies of the complete series of HIV-1 PR inhibitors analyzed in this study is shown in Figure 2. The binding affinity patterns upon a pH change differ greatly for dissimilar inhibitors, as it has been reported earlier.[7] The new data for nelfinavir and saquinavir show that these inhibitors have similar pH dependencies, but that the kinetics are shifted, with saquinavir having 10-fold slower dissociation rates and slightly faster association rates, resulting in higher affinities at all pH values.

In order to rationalize these experimental data, we calculated the protonation states of the HIV-1 PR—inhibitor complexes at the 3 pH values utilized in our SPR experiments, and then used them to predict the binding affinity ranking due to a pH increase. These results are presented below and discussed in a separate section.

3.2. Prediction of pK_a values for protein residues

3.2.1. Validation of the pK_a prediction method

NMR has been the main tool for experimental determination of the protonation state of the titratable residues in HIV-1 PR complexes. The most extensive NMR studies have been carried out on the HIV-1 PR bound to DMP323, a cyclic urea inhibitor.[11] In order to test our pK_a predictor protocol we have calculated the pK_a values of the acidic residues in this complex. As shown in Table 2, the protocol used here reproduces rather well the pK_a values for acidic residues for the HIV-1 protease bound to inhibitor DMP323. Many of our calculated trends reproduce those observed experimentally. For instance, our protocol predicts an upward shift in the pK_a value for the residues AspA25/B25 of the catalytic dyad, with respect to the ones that have been determined for a model Asp residue (pK_a 4.1), in agreement with experiment.[11] Moreover, our calculations indicate that the residues Asp A29/B29 become more acidic than the model compound in solution (pK_a 4.1), a trend that is also in agreement with that of the NMR based results.

3.2.2. Effect of the inhibitor on the HIV-1 PR ionizable residues

Some of the inhibitors studied do not have ionizable fragments (see inhibitors A008, A268 and A369) and thus the protein residues pK_a values can be calculated directly (see results in Table 3). Other inhibitors studied here may be neutral or charged at a given pH value, depending on their environment found in the enzyme. Some of them (i.e., indinavir and saquinavir) have more than one amino group that could be protonated over a large range of pH values. Hence it is necessary to have an estimate of the protonation proclivity for all ionizable groups in an inhibitor, ahead of the protein residue pK_a prediction. For this sake, we have carried out the charge assignment based on Epik pK_a predictions for these inhibitors in solution. For instance, indinavir and saquinavir have several amino groups that could be protonated. Our predictions in solution indicate that in saquinavir, the protonated amino group of the quinoline (pK_a <4.0) is much more acidic than the one that belongs to the decahydroquinoline group (pK_a ~10). Hence this latter amino group will be the only one that may stay protonated at all of the pH values used in this work. On the other hand, our pK_a evaluations of indinavir in solution indicate that the amino group that has the higher probability of being protonated in our pH range is one that belongs to the piperazine at the position closest to the pyridine group. In order to shed light onto the effect of ligand charge on the charge state of the protein residues we have calculated the pK_a values for all protein tritratable residues when bound to ionizable inhibitors both in their neutral and charged states. The results are shown in Table 4. Perusal of this table indicate that the charged state of the ionizable residues in the protein will strongly depend on the protonation state of the bound inhibitor for inhibitors with ionogenic groups, an effect specially noticeable for Asp catalytic dyad residues.

3.2.3. Effect of the dielectric constant (DC) on active site charge states

As pointed out earlier, the DC value for the interior of the protein has a strong effect on the resulting pK_a values of the ionizables residues.[6] As shown before by Trylksa et al.[6] raising the DC of the protein interior in the apo and some holo HIV-1 PR systems may result in a decrease of the pK_a values for the HIV-1 PR Asp dyad residues. Hence there is the possibility that an increment in the DC beyond the value of 5 may lead to HIV-1 PR with Asp dyads in the monoprotonated states, in line with some X-ray crystallographic[12] and NMR results.[10]

Table 5 displays the pK_a values for the Asp dyads of some of the complexes studied here as a function of the DC values. Perusal of

Table 1
Interaction kinetic parameters for nelfinavir and saquinavir at pH 4.1, 5.1 and 7.1

Inhibitor	pH	k_{on} (M^{-1} s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
Nelfinavir	7.4	$8.17 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^3$	$2.8 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$	3.40 ± 0.01
	5.1	$3.05 \times 10^6 \pm 4.08 \times 10^5$	$9 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$	2.99 ± 0.27
	4.1	$1.66 \times 10^6 \pm 7.73 \times 10^5$	$5.3 \times 10^{-2} \pm 9 \times 10^{-3}$	37.6 ± 13.6
Saquinavir	7.4	$1.02 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^3$	$5.86 \times 10^{-4} \pm 9.5 \times 10^{-5}$	0.577 ± 0.095
	5.1	$4.41 \times 10^6 \pm 5.44 \times 10^5$	$2.73 \times 10^{-3} \pm 2.99 \times 10^{-4}$	0.637 ± 0.153
	4.1	$2.78 \times 10^6 \pm 7.1 \times 10^5$	$1.09 \times 10^{-2} \pm 2.08 \times 10^{-3}$	4.13 ± 0.989

The values for the other inhibitors in this study have been published previously.[7] Errors are given as the standard deviation.

Author's personal copy

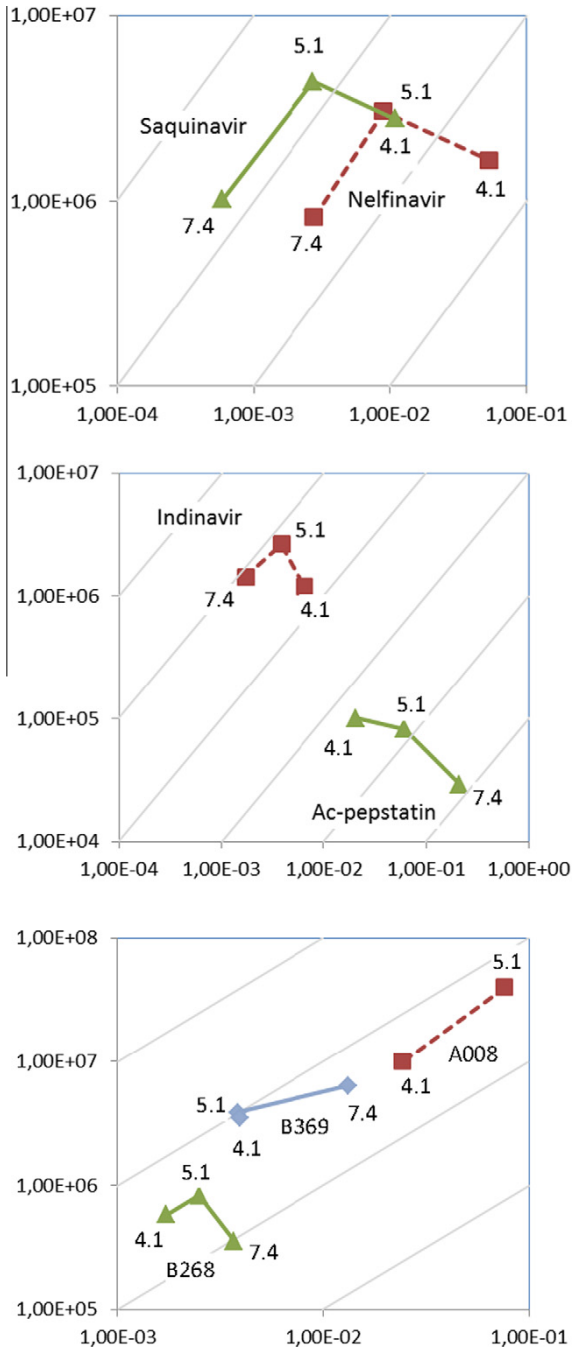


Figure 2. Interaction kinetic plot (k_{on} vs k_{off}) for HIV-1 PR inhibitors at pH 4.1, 5.1 and 7.4. k_{on} and k_{off} units are in M^{-1} s^{-1} and s^{-1}, respectively.

this table indicates that, as expected, increasing the dielectric constant lowers the pK_a values for the Asp dyad residues across the board, irrespective of the chemical structure of the inhibitor. Nevertheless, as we shall see in the next section, the binding affinities calculated with these HIV-1 PR active site charged states do not reproduce as well the affinity trends upon a pH increase as the ones obtained with the lower dielectric constant. (i.e., DC = 5).

Table 2
Comparison of experimental and calculated pK_a values for acidic HIV-1 PR side chains when bound to DMP323

Residue	Calculated	Experimental[a]	
	pK_a	pK_a[b]	pK_a[c]
Asp A25	8.24	8.19	7.7
Asp A29	2.66	2.06	1.97
Asp A30	4.04	3.99	3.96
Asp A60	3.55	3.11	3.15
Asp B25	7.21	8.19	7.7
Asp B29	2.63	2.06	1.97
Asp B30	4.08	3.99	3.96
Asp B60	3.50	3.11	3.15
Glu A21	4.28	4.52	4.48
Glu A34	4.71	4.88	4.91
Glu A35	4.27	3.73	3.75
Glu A65	4.00	3.74	3.72
Glu B21	4.23	4.52	4.48
Glu B34	5.26	4.88	4.91
Glu B35	3.86	3.73	3.75
Glu B65	4.03	3.74	3.72

[a] See Ref. 11 for details.
[b] The experimental pK_a values were determined by fitting the pD dependent chemical shifts using the carboxyl carbon data.
[c] The experimental pK_a values were determined by fitting the pD dependent chemical shifts using the next to carboxyl aliphatic carbon data.

Table 3
Predicted pK_a values for acidic residues when bound to neutral inhibitors

Residue	A008	B268	B369
Asp A25	8.64	10.23	10.24
Asp A29	2.77	3.01	3.51
Asp A30	4.78	4.06	4.08
Asp A60	3.66	3.50	3.60
Asp B25	7.25	6.91	6.70
Asp B29	2.49	3.02	3.84
Asp B30	4.12	3.91	3.69
Asp B60	2.77	3.60	3.47
Glu A21	4.41	4.30	4.25
Glu A34	4.82	5.17	5.23
Glu A35	4.18	4.13	4.15
Glu A65	3.73	3.67	3.65
Glu B21	4.46	4.26	4.26
Glu B34	5.01	5.01	4.98
Glu B35	3.79	3.77	3.95
Glu B65	3.87	3.80	3.77

3.3. Binding affinity pH dependence

3.3.1. Experimental results

Table 6 lists the K_D values obtained by SPR at the three pH values (4.1, 5.1 and 7.4) for all HIV-1 PR—inhibitor complexes studied in this work. The experiments indicate that the HIV-1 PR inhibitors can be classified into three groups, according to the effect of pH on their interaction kinetics and affinities. The first group contains inhibitors that lack any titratable groups (A008, B268 and B369). Although the pH effects on association and dissociation rate constants are different, their affinities are similar at pH 4.1 and 5.1, but lower at 7.4. In the second group formed by Ac-pepstatin, the affinity decreases with increased pH. Finally, the third group of inhibitors (nelfinavir, saquinavir and indinavir) has a similar effect of pH on their interaction kinetics and affinities, with an increase in affinity upon a pH increase from 4.1 to 5.1, but without a further increase when pH becomes neutral (7.4).

3.3.2. Scoring function calculated values

In Table 6 we list also the scoring function values for each inhibitor at the three pH values which allowed us to rationalize the pH

Author's personal copy

Table 4
Predicted pK_a values for acidic residues when bound to inhibitors with titratable groups

Residue	Indinavir		Nelfinavir		Saquinavir		Ac-pepstatin	
	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]
Asp A25	7.21	7.29	6.15	7.36	5.61	6.56	8.67	8.77
Asp A29	2.19	2.42	2.10	2.23	2.84	2.94	2.79	2.80
Asp A30	3.66	3.76	4.40	4.75	4.29	4.37	4.74	4.75
Asp A60	3.42	3.44	3.09	3.11	3.52	3.53	3.46	3.46
Asp B25	9.41	9.57	8.89	9.85	8.03	8.74	7.30	7.41
Asp B29	3.35	3.51	2.11	2.32	2.31	2.52	2.37	3.30
Asp B30	4.56	4.60	3.94	4.08	4.02	4.15	3.88	5.04
Asp B60	3.36	3.37	3.24	3.25	3.01	3.03	3.69	3.72
Glu A21	4.26	4.29	4.38	4.41	4.62	4.63	4.81	4.83
Glu A34	4.32	4.35	4.98	5.05	5.02	5.41	5.31	5.35
Glu A35	4.23	4.25	3.68	3.71	3.74	3.76	4.14	4.15
Glu A65	3.67	3.67	3.58	3.60	3.54	3.55	4.09	4.09
Glu B21	4.47	4.52	4.53	4.55	4.09	4.12	4.95	4.95
Glu B34	4.72	4.83	5.07	5.11	5.20	5.25	4.85	4.86
Glu B35	3.65	3.68	3.97	4.00	4.23	4.25	3.72	3.74
Glu B65	3.83	3.85	3.56	3.57	3.75	3.76	3.46	3.47

[a] Inhibitor in the singly charged state.
[b] Inhibitor in the neutral state.

Table 5
Predicted catalytic dyad pK_a values dependence on the protein dielectric constant

Inhibitor	Catalytic dyad	Protein dielectric constant[a]			
		10	12	15	18/20
A008	Asp A25	8.64	7.74	6.70	6.47
	Asp B25	7.25	6.66	5.93	4.77
B268	Asp A25	10.23	8.86	7.67	6.87
	Asp B25	6.91	6.20	5.50	5.02
B369	Asp A25	10.24	8.96	7.76	6.53
	Asp B25	6.70	6.01	5.32	4.60
Saquinavir	Asp A25	5.61(6.56)	—	—	4.07(4.83)
	Asp B25	8.03(8.74)	—	—	5.63(6.14)

[a] Numbers in parenthesis correspond to those obtained with the neutral inhibitor.

binding ranking based on the charge state of the ligands and protein residues (see discussion).

As pointed out above, increased DC values lead to monoprotonated Asp dyads at the enzyme optimal pH for many HIV-1 PR—ligand complexes, in line with some NMR and neutron diffraction results. Hence, in order to explore the effect of this variable, we calculated the binding affinity for charge distributions at higher DC value. Table 7 displays scoring function affinities for Ac-pepstatin and nelfinavir at DC 18. As seen from this Table affinity prediction calculations for instance for nelfinavir fare worse than those presented in Table 6. This outcome supports to some extent the charge state of the ionizable residues used for the calculations presented in Table 6, at a lower DC value.

4. Discussion

4.1. Effect of the inhibitor on the pK_a of the HIV-1 PR ionizable residues

Perusal of Tables 3 and 4 shows that the chemical structure and charge state of the inhibitors have a profound influence on the pK_a values of the side chains of titratable residues. Nevertheless, there are some commonalities amongst the protein residues pK_a trends. For instance, our calculations indicate that the largest pK_a shifts, with respect to the values of model compounds in solution, are for the acidic residues that lie in the inhibitor binding pockets, especially those that reside in S1/S1′ (e.g., those that belong to the Asp dyad). These latter residues vary their pK_a values by several units upon change of inhibitor. By comparison, the other acidic res-

Table 6
Effect of pH on experimental and calculated affinity value

Inhibitor	Scoring function (kcal/mol)[a]			K_D (nM)[d]		
	pH 4.1[b]	pH 5.1	pH 7.4[c]	pH 4.1	pH 5.1	pH 7.4
A008	−79.85 (−**79.98**)	−**80.18**	−**78.75**	1.83	1.84	6.95
B268	−**87.22**	−**87.46**	−**85.50**	2.97	3.00	10.80
B369	−99.93 (−**101.35**)	−**101.42**	−**99.69**	1.14	1.00	13.90
Indinavir			−100.76 (−**92.82**)	5.45	1.38	1.20
Indinavir (+)	−**88.55**	−**91.96**	(−92.82)			
Nelfinavir		−**91.5**	−90.70 (−**90.80**)	37.6	2.99	3.40
Nelfinavir (+)	−**88.55**	−89.12	−92.80			
Saquinavir		−**92.38**	−**96.23**	4.13	0.637	0.577
Saquinavir(+)	−**91.44**	−92.49	−94.89			
Acpepst	−**95.73**	−88.80	−94.2 (−95.0)	208	759	8150
Acpepst (−)	—	−**92.17**	−**91.84**			

[a] Thick numbers indicate the protonation states that have similar trends to the experimental.
[b] Values in parentheses were calculated by weighting the affinities obtained by taking into account both protonation states for the residue Asp 30.
[c] Values in parentheses were calculated by weighting the affinities obtained by taking into account both protonation states for the residue Asp 25.
[d] Data from Table 1 (nelfinavir and saquinavir) and Ref. 7.

Author's personal copy

Table 7
Calculated binding affinity scoring funtion values in kcal/mol at DC 18

Inhibitor		pH value		
		4.1	5.1	7.4
Nelfinavir	Charged	−98.81	−97.95	−96.93
	Neutral	−96.73	−96.84	−94.13
Ac-pepstatin	Charged	−108.59	−108.47	−104.62
	Neutral	−109.02	−104.29	−102.93

idues that reside in S2/S2′ and S3/S3′ pockets display smaller but noticeable changes, like for instance the downward pK_a shift in AspB30 when bound to the charged Ac-pepstatin. This trend can be traced back to the binding site structure (see Fig. 3), which shows that this residue is part of an intricate microenvironment, making polar interactions with the C-terminal carboxylate of the inhibitor and with the side chain of Lys B45. The overall predicted shifts for all acidic residues follow similar trends to the ones observed in NMR experiments for the HIV-1 PR—DMP323 complex.[11]

On the other hand, NMR based protonation state assignment for the Asp dyad when HIV-1 PR is bound to pepstatin A[27], are at variance with our predictions for the Asp dyad when the enzyme is bound to Ac-pepstatin. Our results indicate that the Asp dyad will only be in the monoprotonated state at the highest pH (7.4), while the NMR results support a single charged Asp dyad over a wider range of pH values. The experimental support for the monoprotonated state was obtained from the analysis of ^{13}C NMR data, which exhibits two distinct signals at 172.4 and 178.8 ppm that remain unchanged in the pH range between 2.5 and 6.5, thus indicating that the Asp dyad protonation state does not change in this pH range. Of the two peaks, the one at low field is the only one that undergoes an isotopic shift.[27] Nevertheless, these NMR results seem to be amenable to more than one interpretation. Piana et al.[13] proposed a diprotonated Asp dyad based on an ab-initio molecular dynamics assignment that includes the calculation of ^{13}C chemical shifts and isotopic shifts. In their work, they show that the only Asp dyad charged state that reproduces these NMR observables is the neutral one, in agreement with our predictions. For other inhibitors, like KNI-272, recent results of a high resolution X-ray structure, together with a neutron diffraction study[12] display the existence of electron density only next to the oxygen of one of the Asp residues in the Asp dyad, supporting the existence of a monoprotonated assignment for this system.

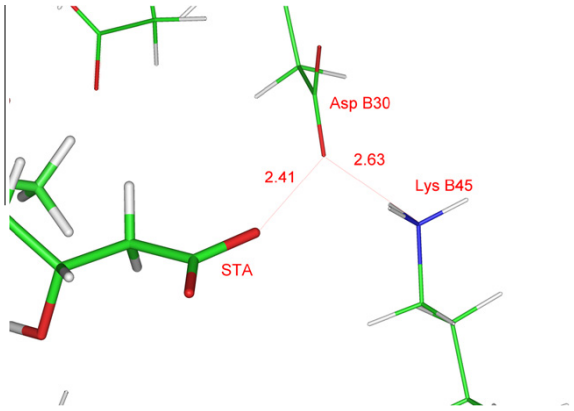


Figure 3. Microenvironment of the Asp B30 residue when bound to acetylpepstatin. Notice the closeness of the C-terminal carboxylate of the statine residue (STA) of the inhibitor with the side chains of Asp B30 and Lys B45. Distances are in Å.

The results shown here suggest that the Asp dyad charge state is neutral at the pH value at which the enzyme is most active (i.e., 5–6), since the pK_a values of their Asp residues are for the most part above six. The results listed in Tables 3 and 4 predict that the Asp dyad monoprotonated state is only prevalent at the highest pH value (7.4) when HIV-1 PR is bound to inhibitors B268, B369, indinavir, nelfinavir and saquinavir. As seen from these tables, the complex where the Asp dyad becomes monoprotonated at the lowest pH (5.6) is the one formed with saquinavir, when this ligand is protonated.

We propose a possible explanation for this result based on the existence of a low barrier hydrogen bond (LBHB) between a hydroxyl group located on the inhibitor's isostere and the oxygen of a carboxylate group that belongs to the Asp dyad (See below). One of the defining characteriztics for a LBHB is the existence of a very short hydrogen bond distance between donor and acceptor.[28] Already, in some of the earliest crystallographic structures of HIV-1 PR complexes (eg., HIV-1 PR bound to Ac-pepstatin) it was observed that the distance from the hydroxyl oxygen of the inhibitor to one of the oxygens of the side chain of an Asp dyad member could be as short as 2.2 Å,[17] raising the possibility of a LBHB between these two atoms.

The existence of compact hydrogen bonds (HB's), that provide support for LBHB's, have been confirmed by the X-ray and neutron diffraction studies of ligand bound aspartic proteases, like in endothiapepsin,[29] and in BACE-1 bound to peptidic inhibitors,[30] suggesting that LBHB's may be a common feature for some aspartic protease-inhibitor complexes. It has been posited that in LBHB's, the proton that mediates the HB could undergo tunnelling, from the energy-well located next to the hydroxyl oxygen to the one next to the carboxylate oxygen.[28] In such a system the proton could be found at both positions (see Fig. 4, panel B), resulting in the dispersion of the negative charge of the Asp residue. It may be argued that the tunnelling in the LBHB populates the Asp dyad diprotonated state, and hence it may be claimed that this charged state could be a molecular mechanics compromise representation of the entities implied by LBHB (Fig. 4).

Finally, the results presented in Tables 3 and 4 indicate that the protonation states of the HIV-1 PR titratable residues will depend strongly on the chemical structure and ionization state of each inhibitor, a similar result to that obtained recently by us on BACE-1, another member of the aspartic protease family which has become an Alzheimer's disease drug target.[1]

4.2. Binding affinity pH dependence

Table 6 lists the experimental as well as the inhibitor affinities predicted by our scoring function. There are two issues that are crucial for comparing the calculated affinities to the experimental ones. The first one relates to the fact that in some cases the pK_a values of some of the acidic residues present in the active site of HIV-1 PR (e.g., Asp 25, Asp 30) are very close to the pH values used in the evaluation of the binding affinities. In that case these residues could be highly populated both in their neutral and charged protonation states. For instance, as seen from Table 3, when HIV-1 PR is bound to inhibitor B369, the calculated pK_a value for residue Asp A30 is 4.08, leading to almost equal populations of ionized and neutral charged states for this residue at pH 4.1. Another example relates to the Asp dyad residues, which exhibits large pK_a shifts to values that are more typical for basic residues. In some cases (indinavir, nelfinavir) their pK_a values are close to the highest pH value studied (7.4), resulting also in similar populations at both charged states for the Asp A25 residue. We take into account the existence of multiple protonation states into the binding affinity scoring function Eq. (2) (see methods section), which weights the scoring value function for each possible charged state by their protonation

Author's personal copy

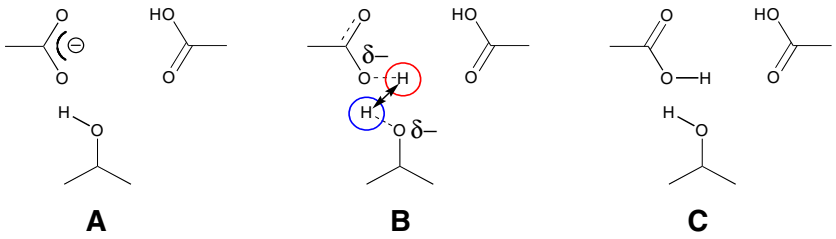


Figure 4. (A) and (C) represent two of the three possible protonation states (mono- and di-protonated) for the Asp dyad, (B) is a schematic representation of a LBHB with the possible proton positions enclosed by red and blue circles.

fractions. Taking into account both charged states in our binding affinity calculation improves in some cases the binding ranking affinity agreement with experimental results. For instance, taking into account the multiple protonation states for Asp A30 increases the binding affinity of B369 for HIV-1 PR at pH 4.1, bringing it closer to that of pH 5.1, in agreement with experiment. Also, as seen from Table 6, taking into account the dual protonation state for Asp A25 ($pK_a = 7.3$) helps to lower the calculated binding affinity, bringing the ranking binding affinity of indinavir at pH 7.4 more in step with experiment.

The other factor that has a strong effect on the binding affinity ranking is the charge state of the inhibitor. As mentioned above, our prediction for the pK_a values of the inhibitors ionizable groups indicate that, nelfinavir, indinavir and saquinavir have each one amino group whose protonated state has a pK_a value above 7, in solution. Nevertheless, perusal of the active site in the ligand–pro-

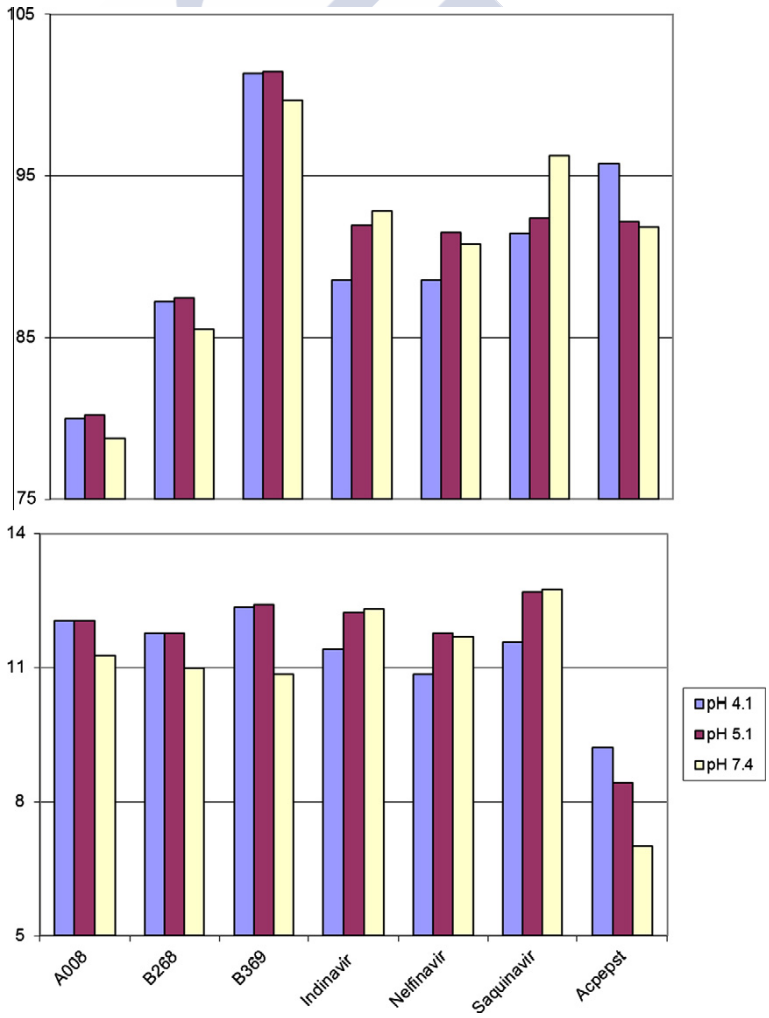


Figure 5. Comparison of the affinity at different pH values obtained by SPR experiments (lower panel) and those obtained from our calculated scoring function in absolute values (upper panel). Values are in kcal/mol.

Author's personal copy

tein structures indicates that the inhibitors' amino groups do not form hydrogen bonds or ion pairs with any protein polar groups. This raises the possibility that the protonated amino group's pK_a value in these inhibitors would be lower than the ones predicted in solution, leading to a neutral ligand at lower pH value (when bound) than in solution. In order to search for the actual amino group protonation state in these inhibitors we have calculated the scoring function binding affinity for a variety of amino group protonation states, starting with those predicted by the Epik module in the Schrödinger software suite.[24] In the case of nelfinavir, the scoring function results that rank binding affinities better are the result of neutralizing the amino group at pH above or around 5.1. This outcome supports the notion that the pK_a value for the most basic protonated amino group is around this value and suggests a possible explanation for the increase in binding affinity when the pH rises to 5.1. The neutralization of the ligand at pH 5.1 generates a more hydrophobic molecule with a lower desolvation penalty (results not shown), a result that favors binding to the enzyme.

The inhibitor Ac-pepstatin has a carboxylate group in its C-terminal end (see Fig. 1). The Epik calculations in solution predict that this group has a pK_a of 4.4. Hence, if this pK_a is maintained upon binding, this group will be neutral at pH 4.1 and charged at the higher pH values. In order to probe these alternatives we have calculated the protein pK_a values for the two possible inhibitor charge states, prior to the calculation of their binding affinities by our proposed scoring function. As seen from Table 6, our results are in good agreement with the experimental trends, when the above mentioned carboxylate keeps its Epik calculated pK_a value of 4.4. The rationale for this outcome may reside in the polar microenvironment this group is located in (see Fig. 3).

In summary, when both issues (discussed above) that relate to the multiple protonation states of the protein residues and the inhibitor protonation state change at a given pH are taken into account, there is a fair correlation between the observed and calculated binding affinity trends, upon a pH increase. This correlation is better visualized in Figure 5, which graphically display the experimental and observed binding affinity trends.

The results described here raise the possibility of designing inhibitors with different affinity pH dependencies. For instance, we predict that replacement of the C-terminal carboxylate group by a polar non-charged group like an amide may lead to an increase (rather than a decrease) in affinity when the pH rises from 5.1 to 7.4 (see Table 6).

The experimental affinity trends amongst inhibitors, at a given pH value, are not as well reproduced as those related to an increase in pH (see Table 6). This may be related to the conformational entropy penalty contributions from inhibitors that have substantial structural differences. For instance, Ac-pepstatin is predicted to have a higher affinity than A008, in contrast to the experimental trend (see Table 6). Perusal of the chemical structures indicate that the latter inhibitor has a peptidic nature and has many more degrees of freedom than A008 and hence should 'pay' a much higher entropic penalty upon binding to the enzyme. Including the conformational entropic terms should bring the predicted ranking more in line with experiment.

5. Conclusions

In summary, the dependence of the binding affinity to HIV-1 PR on pH was studied by determining the binding affinity of a series of inhibitors at three pH values, by SPR experiments. The results were rationalized by a molecular mechanics based protocol that requires knowledge of the protonation states of all ionizable residues in the HIV-1 PR—inhibitor complexes at the 3 pH values used in this study. Hence, it is of the essence for our calculations to have a robust pK_a predictor. We have validated our algorithm by calculating the pK_a values of all residues in the HIV-1 PR—DMP323 complex and comparing the resulting values with those obtained from NMR experiments. The results indicate that our calculations reproduce rather well the experimental values, validating our pK_a protocol prediction.

Our calculations show that upon inhibitor binding, many ionogenic residues display noticeable shifts from their standard values in solution. The highest pK_a increases are observed for the Asp dyad residues. We hypothesize that LBHB's between one of Asp dyad carboxylate oxygens and a the isotere hydroxyl group are of the essence in rationalizing the Asp dyad protonation states when the HIV-1 PR is in the bound state and bring them in line with some experimental observations.

For the most part, the binding energy differences observed by SPR experiments upon a pH change are rather small. Nonetheless, the calculated trends on binding affinity upon pH increase reproduce with few exceptions the ones observed in the SPR experiments. Our binding affinity predictions support our protein assignments. Moreover, we show that alternative protonation states (that could be present by increasing the protein interior DC) are not able to reproduce the experimental binding affinity trends across the board, a result that lends support to our charge assignment for ionizable residues. On the other hand, the binding affinity trends from one inhibitor to another at a given pH are not well reproduced, since our calculations lack a full evaluation of entropic contributions.

Our calculations support the hypothesis that at a given pH, some acidic residues contribute to the binding affinity to the enzyme through both neutral and charged states. Furthermore, our results also indicate that the inhibitor's titratable groups may have a strong effect on the binding affinity trends by modifying their protonation state upon a pH change. Finally, our studies raise the possibility of designing novel inhibitors with alternative binding affinity pH profiles, which we aim to pursue in further studies.

Acknowledgments

This work was supported by financial aid from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain and the Xunta of Galicia to M.C.V. and F.S., the Swedish Research Council (VR) to H.D., and a scholarship from the MEC to J.L.D. The Supercomputing Center of Galicia (CESGA) provided computer time.

References and notes

1. Domínguez, J. L.; Christopeit, T.; Villaverde, M. C.; Gossas, T.; Otero, J. M.; Nyström, S.; Baraznenok, V.; Lindström, E.; Danielson, U. H.; Sussman, F. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7255.
2. Gosh, A. K. Ed. Aspartic acid proteases as therapeutic targets. Wiley-VCH: Weinheim, 2010. Part Two pp. 107-262.
3. Wlodawer, A.; Vondrasek, J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 249.
4. Velazquez-Campoy, A.; Luque, I.; Todd, M. J.; Milutinovich, M.; Kiso, Y.; Freire, E. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1801.
5. Tripathi, A.; Fornabio, M.; Spyrakis, F.; Mozzarelli, A.; Cozzini, P.; Kellog, G. E. *Chem. Biodiv.* **2007**, *4*, 2564.
6. Trylksa, J.; Antosiewicz, J.; Geller, M.; Hodge, C. N.; Klabe, R. M.; Head, M. S.; Gilson, M. K. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 180.
7. Gossas, T.; Danielson, U. H. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 203.
8. Shuman, C. F.; Vrang, L.; Danielson, U. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5953.
9. Markgren, P.-O.; Schaal, W.; Hämäläinen, M.; Karlén, A.; Hallberg, A.; Samuelsson, B.; Danielson, U. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5430.
10. Wang, Y.-X.; Freedberg, D. I.; Yamazaki, T.; Wingfield, P. T.; Stahl, S. J.; Kaufman, J. D.; Kiso, Y.; Torchia, D. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9945.
11. Yamazaki, T.; Nicholson, L. K.; Torchia, D. A.; Wingfield, P.; Stahl, S. J.; Kaufman, J. D.; Eyermann, C. J.; Hodge, C. N.; Lam, P. Y. S.; Ru, Y.; Jadhav, P. K.; Chang, C.-H.; Weber, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10791.
12. Adachi, M.; Ohhara, T.; Kurihara, K.; Tamada, T.; Honjo, E.; Okazaki, N.; Arai, S.; Shoyama, Y.; Kimura, K.; Matsumura, H.; Sugiyama, S.; Adachi, H.; Takano, K.;

Author's personal copy

Mori, Y.; Hidaka, K.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y.; Kuroki, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 4641.
13. Piana, S.; Sebastiani, D.; Carloni, P.; Parrinello, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8730.
14. Markgren, P.-O.; Lindgren, M. T.; Gertow, K.; Karlsson, R.; Hämäläinen, M.; Danielson, U. H. *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 207.
15. Karlsson, M.; Pavlov, M. Y.; Malmqvist, M.; Persson, B.; Ehrenberg, M. *Biochemie* **1999**, *81*, 995.
16. Andersson, H. O.; Fridborg, K.; Löwgren, S.; Alterman, M.; Mühlman, A.; Björsne, M.; Garg, N.; Kvarnström, I.; Schaal, W.; Classon, B.; Karlén, A.; Danielsson, U. H.; Ahlsén, G.; Nillroth, U.; Vrang, L.; Öberg, B.; Samuelsson, B.; Hallberg, A.; Unge, T. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1746.
17. Fitzgerald, P. M. D.; McKeever, B. M.; VanMiddlesworth, J. F.; Springer, J. P.; Heimbach, J. C.; Leu, C.-T.; Herber, W. K.; Dixon, R. A. F.; Darke, P. L. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14209.
18. Mahalingam, B.; Wang, Y.-F.; Boross, P. I.; Tozser, J.; Louis, J. M.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1516.
19. Tie, Y.; Kovalevsky, A. Y.; Boross, P.; Wang, Y.-F.; Ghosh, A. K.; Tozser, J.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. *Proteins* **2007**, *67*, 232.
20. Momany, F. A.; Klimkowski, V. J.; Schäfer, L. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 654.
21. Spassov, V. Z.; Yan, L. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1955.
22. Discovery Studio, version 2.1, Accelrys Inc., San Diego, CA.
23. Shelley, J. C.; Cholleti, A.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Timlin, M. R.; Uchimaya, M. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 681.
24. Epik, version 2.2, Schrödinger, LLC., New York, NY, 2011.
25. Im, W.; Lee, M. S.; Brooks, C. L., III *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1691.
26. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187.
27. Smith, R.; Bereton, I. M.; Chai, R. Y.; Kent, S. B. H. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 946.
28. Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B. *Science* **1994**, *264*, 1927.
29. Coates, L.; Tuan, H.-F.; Tomanicek, S.; Kovalevsky, A.; Mustyakimov, M.; Erskine, P.; Cooper, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7235.
30. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. *Science* **2000**, *290*, 150.

Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net

Current Pharmaceutical Design, **2013**, *19*, **4257-4275** **4257**

On the Active Site Protonation State in Aspartic Proteases: Implications for Drug Design

Fredy Sussman[a,*], M. Carmen Villaverde[a,*], José L. Domínguez[a] and U. Helena Danielson[b]

[a]*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain;* [b]*Department of Chemistry-BMC, Uppsala University, Uppsala, Sweden*

Abstract: Aspartic proteases (AP) are a family of important hydrolytic enzymes in medicinal chemistry, since many of its members have become therapeutical targets for a wide variety of diseases from AIDS to Alzheimer. The enzymatic activity of these proteins is driven by the Asp dyad, a pair of active site Asp residues that participate in the hydrolysis of peptides. Hence, the protonation state of these and other acidic residues present in these enzymes determines the catalytic rate and the affinity for an inhibitor at a given pH. In the present work we have reviewed the effect of the protonation states of the titratable residues in AP's both on catalysis and inhibition in this family of enzymes. The first section focuses on the details of the catalytic reaction mechanism picture brought about by a large number of kinetic, crystallographic and computational chemistry analyses. The results indicate that although the mechanism is similar in both retroviral and eukaryotic enzymes, there are some clear differences. For instance, while in the former family branch the binding of the substrate induces a mono-ionic charge state for the Asp dyad, this charge state seems to be already present in the unbound state of the eukaryotic enzymes. In this section we have explored as well the possible existence of low barrier hydrogen bonds (LBHB's) in the enzymatic path. Catalytic rate enhancement in AP's could in part be explained by the lowering of the barrier for proton transfer in a hydrogen bond from donor to acceptor, which is a typical feature of LBHB's. Review of the published work indicates that the experimental support for this type of bonds is rather scarce and it may be more probable in the first stages of the hydrolytic mechanism in retroviral proteases. The second section deals with the effect of active site protonation state on inhibitor binding. The design of highly potent AP inhibitors, that could be the basis for drug leads require a deep knowledge of the protonation state of the active site residues induced by their presence. This vital issue has been tackled by experimental techniques like NMR, X-ray crystallography, calorimetric and binding kinetic techniques. Recently, we have developed a protocol that combines monitoring the pH effect on binding affinities by SPR methods and rationalization of the results by molecular mechanics based calculations. We have used this combined method on BACE-1 and HIV-1 PR, two important therapeutic targets. Our calculations are able to reproduce the inhibitor binding trends to either enzyme upon a pH increase. The results indicate that inhibitors that differ in the Asp dyad binding fragments will present different binding affinity trends upon a pH increase. Our calculations have enabled us to predict the protonation states at different pH values that underlie the above mentioned trends. We have found out that these results have many implications not only for *in silico* hit screening campaigns aimed at finding high affinity binders, but also (in the case of BACE-1) for the discovery of cell active compounds.

Keywords: Aspartic proteases, ionizable residues, pH effect, Asp catalytic dyad, protonation states, low barrier hydrogen bonds, HIV-1 PR, BACE-1.

INTRODUCTION

All biological systems require hydrolysis of peptides and proteins for many of their functions. This is true even for a virus like the human immunodeficiency virus (HIV), an entity that hijacks the replication machinery of the host cell for its duplication. Central to the budding of a new viral particle is the coding of a proteolytic enzyme that processes viral polyproteins into proteins that are vital for viral replication. The peptide hydrolysis is performed by some enzymes referred to as peptidades, proteases, proteinases or peptide hydrolases. The proteolytic activity catalyzed by these enzymes is vital for the regulation of many processes, which include a variety of rapid response activities, cell growth, tissue homoestasis and the stimulation of cell division, across all types of organisms [1].

One of the most important groups of proteolytic enzymes, from the therapeutic point of view, is the aspartic proteases (AP's). These enzymes have become drug targets for a wide variety of diseases that range from the break up of the blood pressure cascade, cancer, bacterial and fungal infections to neuro-degenerative diseases [1-8]. The importance of this family of proteins has been underscored by the numerous monographic books and reviews published (see for instance references 9-11). One of the most successful endeavours in rational structure based drug design involved the development of HIV-1 protease (a viral aspartic protease) inhibitors, as part of a cocktail therapy called HAART (highly active antiretroviral therapy), that has substantially reduced the AIDS fatality rate [1]. In the process of drug discovery, this enzyme has become the most studied enzyme ever by both experimental and molecular simulation methods. Other member of this enzyme family, renin, participates in the regulation of blood pressure through its role in the renin-angiotensin system. Recently, a 30 year effort culminated in the development of the first renin inhibitors used in clinic [1, 12]. Another member of this family that has lately risen to the level of a therapeutic target is BACE-1, an enzyme involved in the hydrolytic process that leads to amyloidosis [1, 6, 7].

All the aspartic proteases reviewed here belong to the clan AA and can be classified into family A1 (those from eukaryotic organisms) and family A2 (those from retroviral sources, like the HIV), according to the MEROPS data base [13].

Some of the distinctive features of these enzymes are a secondary structure that is mainly based on a beta sheet architecture and a catalytic machinery made up of two Asp residues, located at the base of the catalytic cleft formed by two beta strands. These two residues form the characteristic Asp dyad of aspartic proteases. A water molecule is located between these two residues and was found to be the nucleophile of the hydrolytic process catalyzed by these enzymes [1, 9, 10].

The enzymes of family A1 are typically secreted from cells as inactive proenzymes that are, in most cases, autocatalytically acti-

*Address correspondence to these authors at the Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain; Tel/Fax: +34-8818-14402;
E-mails: fredy.sussman@usc.es; mc.villaverde@usc.es

1873-4286/13 $58.00+.00 **© 2013 Bentham Science Publishers**

vated at acidic pH. The members of this family have evidently evolved by gene duplication, and the lobes containing the two catalytic Asp residues are homologous. The catalytic site is located between the two lobes of the molecules, and a "flap" structure (see Fig. **1**) containing a conserved Tyr residue controls specificity. Several of the peptidases in this family are glycosylated (e.g. cathepsin D) and a few are membrane-bound (BACE-1 and BACE-2). The archetypal peptidase of this family, pepsin A, has long been known to catalyze the proteolysis of food proteins in the vertebrate stomach, and was in fact the second enzyme to be crystallized [14].

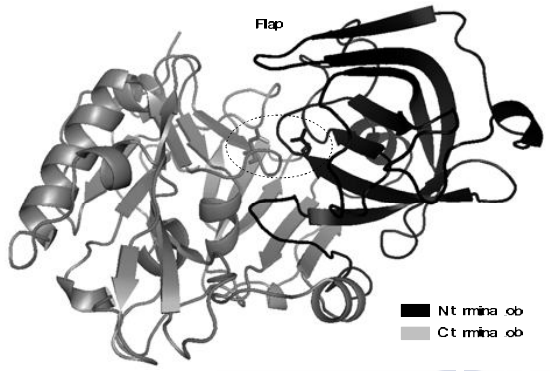


Fig. (1). Cartoon representation showing the ectodomain of BACE-1 (PDB file 1SGZ). Notice the position of the flap and the catalytic dyad (enclosed by an oval). The N- and C- terminal lobes are drawn in different colors.

The A2 family (that encompasses retropepsins) was discovered in the late 1980's as a result of the essential role of HIV-1 protease (HIV-1 PR) in the maturation of the human immunodeficiency virus responsible for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Retropepsins are active only as homodimers (see Fig. **2**). The monomers are structurally related to one lobe of the pepsin molecule and each monomer also includes a structural element equivalent to the "flap" in pepsin like AP's.

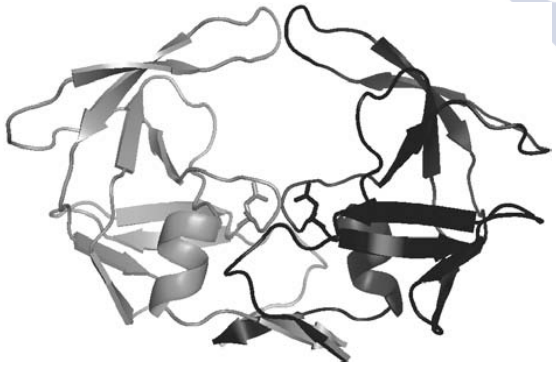


Fig. (2). Cartoon representation of the HIV-1 PR dimer (PDB file 3HVP) showing the side chains of the catalytic dyad. Each monomer is drawn in a different color.

The understanding of the reaction and inhibition mechanism of the aspartic proteases requires a profound knowledge of the change in protonation state of the Asp dyad and other ionogenic residues upon the binding of a substrate or an inhibitor. In this work we review the experimental and the theoretical lines of research devoted to understanding these aspects of catalysis and inhibition in this type of enzymes. In the final part of this work we review a protocol (developed in our laboratory) that combines experimental and simulation tools for studying the effect of pH on the binding affinity of HIV-1 PR and BACE-1 inhibitors, using as a starting point the predicted pK_a values of the ionogenic residues in these enzymes. This issue is of substantial relevance for a more efficient design of inhibitors that are effective under a range of pH conditions.

CATALYTIC MECHANISM OF ASPARTIC PROTEASES

I. General Mechanism

Aspartic proteases are characterised by the presence of two active site aspartate residues whose carboxylate side chains are involved in catalysis. They characterize themselves for their ability to operate at low pH, with the enzyme pepsin operating in the pH range 2-4, making it well suited for the acidic environment of the stomach. This pH requirement becomes apparent when we examine the mechanism of these enzymes, since one of the two aspartate residues must initially be protonated and the other should be deprotonated for activity. The catalytic mechanism is thought to involve nucleophilic attack of an active site water molecule on the scissile bond carbonyl generating a tetrahedral *gem*-diol intermediate (Scheme **1**) [15]. The design of first generation inhibitors generally involves the use of short oligopeptides containing a transition state analogue which mimics this tetrahedral intermediate.

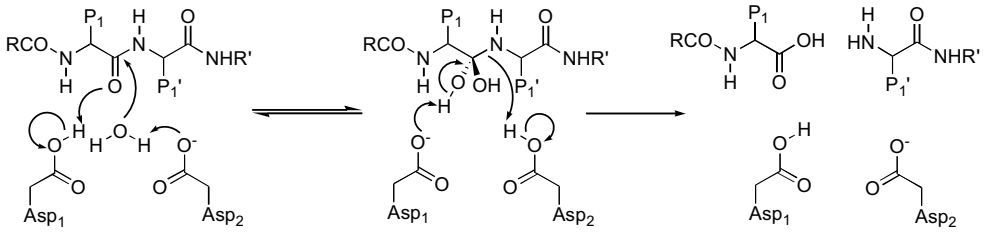
The structural configuration of the Asp residues within the active site formed at the dimeric interface in HIV-1 PR is indistinguishable from those of the monomeric (pepsin-like) aspartic proteases (see Figs. **1** and **2**). It is therefore reasonable to suggest that the aspartic proteases of retroviral and nonviral origin operate by similar chemical mechanisms [16]. In the configuration of the Asp catalytic dyad, the oxygens that are at a closest distance are facing the protein interior and are termed inner or internal oxygens. The other carboxylate oxygens are more separated and are termed external or outer oxygens.

The active site Asp groups assume opposite roles in the general acid-general base catalysis. The deprotonation of the lytic water molecule is performed by the unprotonated aspartyl residue and the polarization (or protonation) of the scissile carbonyl oxygen is achieved by the protonated aspartyl residue.

Comparative studies by Andreeva & Rumsh [17] showed that the interaction of the external O atoms of the catalytic dyad with the residues surrounding the active site preserves the negative charge of one of the Asp side chains and the protonated state of the other, independently of the pH value. Such a system of regulation is a characteristic property of all aspartic proteases of higher organisms, functioning at various pH values, and is the result of their evolutional adaptation. Simple homodimeric structures present in retroviral protease do not posses such a regulating system, their function in cells is limited to a narrow interval of pH common to all of them, not far from the pK_a of carboxyl groups, and the charge asymmetry of the active site arises only after substrate binding [17].

II. Peptidomimetic Transition-state Analogue Inhibitors

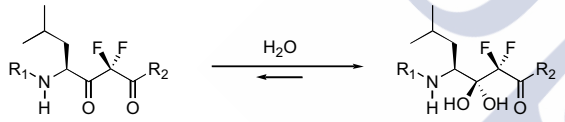
Peptidomimetic inhibitors of aspartic proteinases have been used successfully, not only as drugs leads in many diseases, but also for probing the enzyme's function and the catalytic mechanism of the reaction. For instance, pepstatin (also known as pepstatin A) is a compound that inhibits both type A1 and A2 aspartic proteases, and hence the inhibition of an enzyme by pestatin is used as partial proof that it belongs to this type of enzymes. Pepstatin is a hexapeptide containing the unusual aminoacid statine (Sta, (3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid), having the sequence isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta. It was originally isolated from cultures of various species of *Actinomyces* and discovered as an inhibitor of pepsin by Umezawa *et al*. [18]. The OH in the central Sta residue occupies the position of the water molecule bound to the catalytic dyad in the native enzyme and hence this inhibitor acts as



Scheme 1. General catalytic mechanism for aspartic proteases.

an analogue of the tetrahedral transition state intermediate (see Scheme **1**).

Perusal of the catalytic reaction mechanism (see Scheme **1**) indicates that inhibitors containing a *gem*-diol unit may be useful as mimic of the tetrahedral intermediate of the reaction. The stability of the *gem*-diol bound complexes derived from a difluorostatone (StoF2) moiety make them attractive for this objective. Since then, the structures of various aspartic proteases bound to this type of inhibitors [19, 20, 21] have served to clarify many aspects of the reaction mechanism. These compounds are obtained *in situ* by hydration from a statone unit (Scheme **2**).



Scheme 2. Structure of a difluorostatone ($StoF_2$) moiety in dehydrated and hydrated form.

The peptidomimetic inhibitors are not only suitable for exploring the reaction mechanism. Although the ultimate goal of drug discovery is to identify non-peptidic inhibitors, very often the first step in the process toward such compounds is through substrate analogue peptidomimetics, in which the amide scissile bond is replaced by one isostere that resembles the tetrahedral transition-state intermediate. In Fig. **3**, some isosteres used in the preparation of first generation aspartic protease inhibitors are represented.

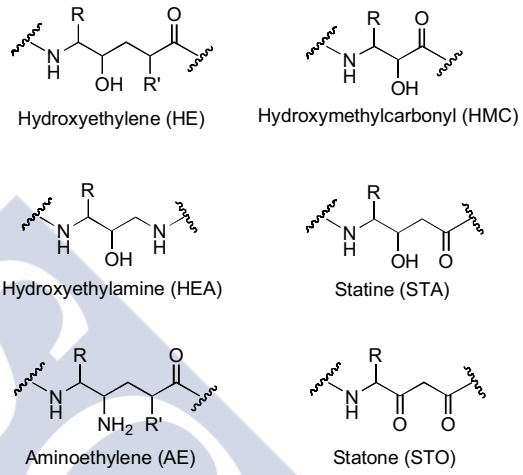


Fig. (3). Examples of transition state isosteres used in the design of aspartic protease inhibitors.

III. Experimental Studies on the Catalytic Mechanism of Pepsin-like (A1 family) Aspartic Proteases

The structures of two A1 family (pepsin-like) aspartic proteases have been determined in complexes with difluorostatone-containing peptide-based inhibitors. The X-ray structures of both complexes, one between the fungal aspartic proteinase endothiapepsin and the fluorostatone-containing tripeptide renin inhibitor CP-81,282 at 2.0 Å resolution [19] and the other between penicillopepsin and the inhibitor isovaleryl-Val-Val-$StoF_2NHCH_3$ at 1.8 Å resolution [20], show a similar pattern of hydrogen bond (HB) interactions for the *gem*-diol moiety in the catalytic binding site (see Fig. **4**).

The X-ray structures show that the pro-(*R*) (statine-like) hydroxyl of the tetrahedral carbonyl hydrate is hydrogen-bonded to both active-site aspartates and occupies the same position as the water molecule oxygen does in the unbound enzyme. The second hydroxyl oxygen of the hydrate is hydrogen-bonded only to the outer carboxyl oxygen of Asp 32 (or Asp33). These experimental data provided a basis for the model of the tetrahedral intermediate in the aspartic protease mediated cleavage of the amide bond.

Two possible complexes with differing locations of the Asp dyad negative charge result from the arrangement of distances. The preferred positions of the protons are shown in Fig. **4** and molecular orbital calculations favor this arrangement [19]. Thus, the high-

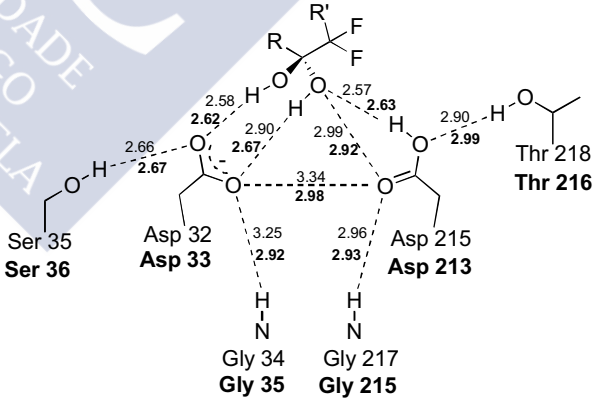


Fig. (4). Interactions of the tetrahedral hydrate with endothiapepsin (PDB file 1EPO, shown in plain characters), and penicillopepsin (PDB file 1APV, shown in bold characters). Distances displayed between the heavy atoms are in Å.

resolution structure of the tetrahedral hydrate suggests a mechanism that resembles the one previously proposed by Suguna *et al*. [22], involving the stabilization of a negatively charged aspartic acid carboxylate first at Asp 215 (or Asp 213) and then in the intermediate at Asp 32 (or Asp 33, see Scheme **1** and Fig. **4**) by a complex HB network at each of the active-site Asp during the catalysis. In each case, the stabilization involves complete inaccessibility of the

carboxylate from bulk solvent and the formation of three or four hydrogen bonds to the carboxylate oxygens (see Fig. **4**) as pointed also by Andreeva [17].

During the reaction, the charge state of the Asp dyad is stabilized by hydrogen bond interactions with residues like Ser 35/36 and Thr 218/216. This result has been corroborated by site-directed mutagenesis experiments of Ser 35 and Thr 218 in chymosin [23]. Their role is also consistent with the higher optimal pH for the catalysis by human renin with Ala at position 218 and retroviral proteases that have Ala at both equivalent positions.

In order to explore the catalytic mechanism, many structural studies of complexes of endothiapepsin with different transition state analogue inhibitors have been carried out by the group of Cooper [24-27]. The data obtained by neutron and atomic resolution X-ray diffraction provide evidence that Asp 215 is protonated and that Asp 32 is the negatively charged residue in the transition state complex. A similar result was obtained for the complex of pepstatin with *Irpex lacteus* aspartic proteinase (ILAP) [28]. The atomic resolution X-ray data showed that the transition state analogues of these inhibitors bind by making several hydrogen bonds with the catalytic aspartates, some of which have donor–acceptor distances as short as 2.5 Å. Hydrogen bonds as short as this are referred to as low barrier hydrogen bonds (LBHB) since the proximity of the donor and acceptor atoms reduces the energy barrier which normally prevents transfer of the hydrogen atom from the donor to the acceptor group [29]. The locations of the LBHB's observed in the endothiapepsin complexes are shown in Fig. **5** [30] where it can be seen that the hydroxyl group of the inhibitor forms an LBHB with the inner oxygen of Asp 32 and another with the outer oxygen of Asp 215. This is consistent with the deuterium positions found in the neutron analysis [24] and other atomic resolution X-ray structures of aspartic proteinases [28].

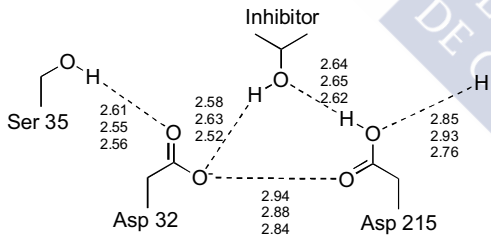


Fig. (5). HB distances for three complexes of endothiapepsin with hydroxyl-containing peptidomimetic inhibitors [30].

A distinguishing property of LBHBs is a large downfield shift detected by ^{1}H-NMR typically between 16 and 21 ppm. Thus, to confirm the existence of the short interactions suggested by the atomic resolution X-ray data, ^{1}H-NMR solution spectra of native endothiapepsin and a number of complexes were recorded [30]. Whilst the NMR spectrum of free endothiapepsin (or the free inhibitor) showed no peaks outside the normal region for protein signals 0– 11 ppm, the complexes gave several peaks between 15.5 and 18.5 ppm.

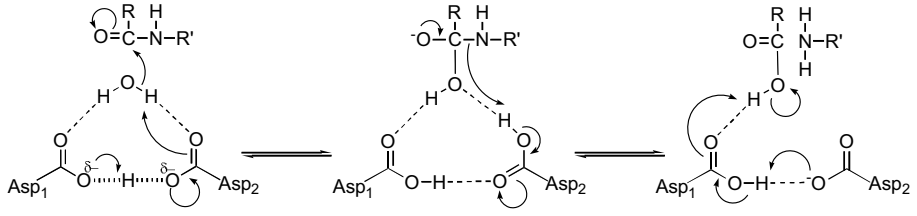
Since LBHB formation facilitates rapid proton transfer, the role of these interactions in enzyme catalysis is the subject of much discussion in the enzymology field [29]. An earlier proposal for the involvement of LBHBs in aspartic proteinase catalysis based on deuterium isotope effects [31] invoked a somewhat different pattern of LBHB formation at the catalytic centre involving a proton shared equally between the two inner aspartate oxygens (see Scheme **3**). The cornerstone for this proposal was drawn from quantum dynamic calculations of the Asp dyad in the unbound HIV-1 PR, which indicated a very low barrier for the proton displacement from one aspartate to the other [32].

Nevertheless, drawing a complete picture of the catalytic mechanism in pepsin like aspartic proteases from calculations performed in HIV-1 PR may not be straightforward. The X-ray structure (at atomic resolution) of unbound endothiapepsin [26] clearly indicates that the bonding geometry for a proton located directly between the two inner aspartate oxygens is unfavorable. An alternative explanation implies that both catalytic aspartates share a single negative charge equally. That is, in the crystal structure, the two Asp dyad protonation states shown schematically in Fig. **6** are equally populated.

Overall, the work described above has provided the first structural evidence that low-barrier hydrogen bonds may be significant in the catalytically driven reaction pathway in aspartic proteases and has helped to locate the LBHB interactions in the catalytic centre, thus giving a sounder footing for evaluating their role in the mechanism [30].

IV. Experimental Studies on the Catalytic Mechanism of HIV-1 PR, an A2 Family Aspartic Protease

Solvent kinetic isotope effects and pH rate studies were applied to elucidate details of the chemical mechanism of HIV-1 PR in the pH range of 3-7 where the enzyme activity is stable [16]. The substrates bind only to HIV-1 PR with a monoprotonated Asp catalytic dyad. This enzyme form contains an unprotonated catalytic group of pK_{a1}=3.4-3.7 and a protonated catalytic group of pK_{a2} = 5.5-6.5.



Scheme 3. Catalytic mechanism of aspartic proteases following the proposal by Northrop [31].

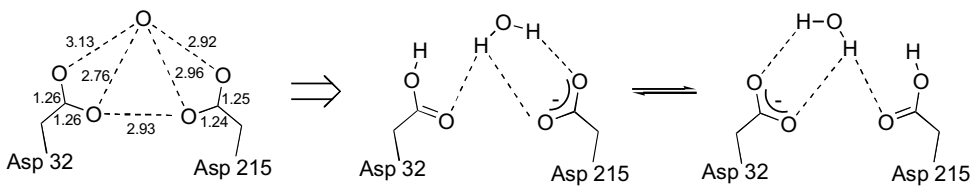


Fig. (6). Two canonical forms in unbound endothiapepsin [26].

Proton inventory data is in accord with the concerted transfer of two protons in the transition state of a rate-limiting chemical step in which the enzyme-bound amide hydrate adduct collapses to form the carboxylic acid and amine products.

The structure of the HIV-1 protease in complex with inhibitor A79285, a pseudo-C2 symmetric inhibitor which contains a central difluoroketone motif (Fig. **7**), has been determined with X-ray diffraction data extending to 1.7 Å resolution [21]. The electron density map clearly indicates that the inhibitor is bound in a symmetric fashion as the hydrated, or *gem*-diol, form of the difluoroketone. Refinement of the complex reveals a unique, and almost symmetric, set of interactions between the geminal hydroxyl groups, the geminal fluorine atoms, and the active-site aspartate residues, with one carboxylate group directly facing the diol hydroxyls and the other one facing the fluorine atoms (Fig. **8**). The mode of binding is similar to that of the *S,S* C2 symmetric diol A76928 [33] and markedly different from that of other difluoroketone/aspartic protease complexes [19, 20].

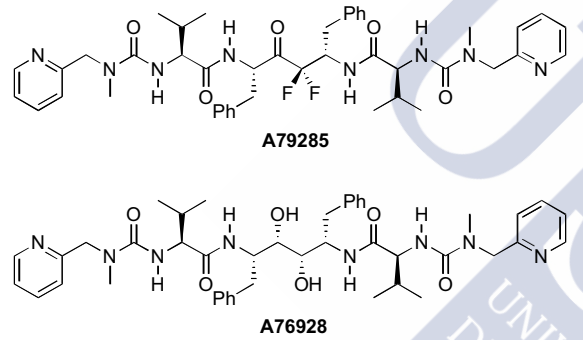


Fig. (7). Chemical structure of inhibitors A79285 and A76928.

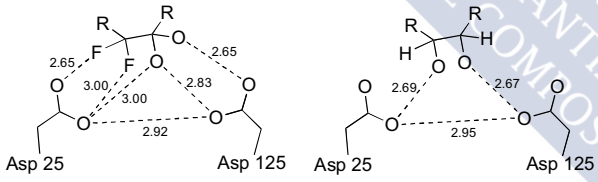


Fig. (8). Distances at 3Å cutoff between the HIV-1 PR catalytic dyad and the core of inhibitors A79285 (PDB file 1DIF, left panel) and A76928 (PDB file 1HVK, right panel).

Several HB patterns are consistent with the observed conformation (Fig. **8**). To elucidate this issue, semi-empirical energy calculations were carried out. The resulting lowest energy hydrogen disposition shows a monoprotoaned dyad in which the protonated Asp residue is adjacent to the to the difluorine motif, while the carboxylate group is adjacent to the *gem*-diol. The inhibitor core is a mimic of a hydrated peptide bond in a gauche conformation. In contrast in difluoroketone containing inhibitors bound to endothiapepsin or penecillopepsin [19,20] the hydrated core of the inhibitors have similar *anti* conformations and display similar interactions with the active site aspartate groups: one of the *gem*-hydroxyls is positioned between both aspartate residues, the other one interacts with a single aspartate, and the fluorine atoms do not interact with either of them (see Fig. **4**).

The feasibility of an *anti-gauche* transition for a peptide bond after hydration was verified by extensive molecular dynamics simulations [21]. During the trajectories the diol frequently passes through an intermediate position where a diol hydroxyl is located between both aspartate residues, in a conformation that resembles the structures of the other aspartic proteases with difluorostatone inhibitors. The simulations suggest that rotation about the C-N scissile bond would readily occur after hydration and would be driven by the optimization of the interactions of peptide side-chains with the enzyme, i.e. the rearrangement of the whole inhibitor to a symmetric form which binds optimally to the protein would drive the inversion, the structure being only fully symmetric at the *gauche* conformation.

These results, together with the characterization of a transition state leading to bond breakage via a concerted exchange of two protons suggest a proteolysis mechanism whereby only one active site aspartate is initially protonated. The steps of this mechanism are: asymmetric binding of the substrate; hydration of the peptidic carbonyl by an active site water molecule; proton translocation between the active site aspartate residues simultaneously with carbonyl hydration, optimization of the binding of the entire substrate facilitated by the flexible structure of the hydrated peptide bond, which, in turn, forces the hydrated peptide bond to assume a gauche conformation. Finally, there seems to be a simultaneous proton exchange whereby one hydroxyl donates a proton to the charged aspartate, and, at the same time, the nitrogen lone pair accepts a proton from the other aspartate, leading to bond breakage and regeneration of the initial protonation state of the aspartate residues (see Sheme 1).

As mentioned before, in the A1 family there is a set of interactions of the Asp catalytic dyad that allows one of the carboxyl groups to retain a charged state and the other a protonated state at any pH value, an arrangement which is necessary for enzymatic activity. No interactions of such type were observed in retroviral proteases, which act a relatively narrow pH range close to the neutral value. Therefore in these latter enzymes the pH value is the only factor that determines whether the active carboxyls are charged. It seems likely that both active site carboxyl groups (which are not shielded from solvent in the free enzyme) should be charged at neutral pH, in accordance with the self-symmetry of these retroviral enzymes. However, two important questions must be solved in order to understand these enzymes, the first question relates to how the two charged carboxyl groups could be as close to each other as X-ray analysis shows and still be charged [34]. The second refers to how do these enzymes function, i.e. how could the catalytic carboxyls change their ionization state as required by the catalysis process.

These questions were partially answered by the quantum-dynamics calculations of the probable states of the active carboxyl groups on the basis of their atomic coordinates [32]. It was found that the system composed of two carboxyls and a water molecule located between their external oxygen atoms would be stable in the case when a proton is located half away between their internal oxygen atoms (Fig. **9**). The hydrogen bond between these oxygen atoms appeared to be remarkable, because the energetic barrier of the proton transfer from one atom to another turned out to be very low. This indicates that the bond must be a low barrier hydrogen bond and the proton shared by these two carboxyl groups was named as a LBHB proton [32]. This result agrees with the self-symmetry of the retroviral protease molecules. At the same time, it shows that slightest deviations from this symmetry may result in the transition of the proton to one of the two oxygen atoms.

In the retroviral proteases there is a symmetrical system of interactions. This symmetry of the system is disturbed upon substrate binding, which results in unequal interactions with the internal oxygen atoms of the catalytic dyad. This assists the transfer of the proton located between them to one of the carboxyl groups. The easiness of the LBHB proton transition to one of the oxygen atoms induces asymmetry in the charge distribution between the carboxyls and determines the possibility of developing the catalytic reaction. As soon as this transfer occurs, the reaction might further develop

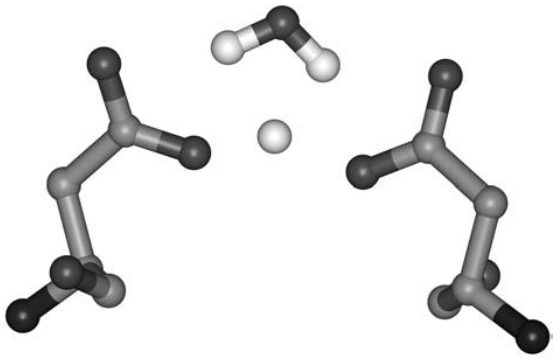


Fig. (9). HIV-1 PR active site model according to Piana & Carloni [32].

according to the standard mechanism (see Scheme **1**). Thus, the appearance of a charge on one of the carboxyl groups with the preservation of the neutral state of the other precedes the catalytic reaction in the retroviral proteases and is due to the interaction of the enzyme with the substrate. In the proteases of higher organisms, the charged state of one carboxyl group and the neutral state of the other exist before substrate binding. This is an important difference between the structure and the properties of aspartic proteases of families A1 and A2.

EFFECT OF THE INHIBITOR ON THE PROTONATION STATE OF THE ACTIVE SITE IN ASPARTIC PROTEASES

As we have seen above, the charge state of the titratable residues lining up the active site of AP's have a profound influence on the catalytic driven reaction mechanism. The early stages of inhibitor discovery were based upon the paradigm that the best inhibitor candidates should be transition state analogues. Hence, the information obtained from the catalytic reaction pathway of AP's was used for inhibitor design, as in the case of *gem*-diol based inhibitors. In turn, the information obtained from the studies of the enzyme-inhibitor complexes, led in many cases to the knowledge of how the charge states of the titratable residues in the active site of these enzymes evolved during the catalytic reaction. As we shall see below, the study of the changes of the charge state of ionizable residues upon inhibitor binding is of the essence in the design of more potent inhibitors in all stages of drug lead search. This line of work has been pursued by many authors, using both experimental and especially computational chemistry tools. In the next sections we review this line of work.

I. Calculation of the Active Site Protonation State in Aspartic Proteases Bound to Inhibitors

Most of the work involved in studying the active site charge state has dealt only with the Asp catalytic dyad. The first attempts used molecular dynamics (MD) calculations of the structures of two HIV-1 PR/inhibitor complexes to shed some light onto the actual protonation state of the Asp dyad. MD calculations were performed for every complex starting from one of the possible Asp dyad charged states (di-anionic, mono-anionic and neutral). The aim was to search the Asp dyad protonation state that maintained the intricate HB network between the ligand and the protein observed in the crystallographic structure, which was then identified as the most likely charged state [35]. The results indicate that, from all possible charged states, only one agrees well with the crystallographic data for each inhibitor. Much of the later work aimed at predicting the protonation state of the Asp dyad in other AP's like BACE-1 [36] and plasmepsin II [37] started from a monoionic guess for the Asp dyad. (i.e., charge of -1) based on experimental and theoretical data for some inhibitors. Hence, the MD based simulations limited themselves to the assignment of the protonated state to one of the members of the Asp dyad. For this sake, two parallel MD trajectories of BACE-1complexed with the potent inhibitor OM99-2 were carried out to determine the preferred protonation state of the Asp dyad in the context that is consistent with the observed X-ray crystal structure. The results show that a strong hydrogen bond between the inhibitor hydroxyl group and Asp228 can be maintained only when Asp32 is neutral and Asp228 is ionized [36].

Quantum mechanical (QM) calculations have also been applied to the understanding of the protonation state of the Asp dyad [38, 39, 40]. For instance Rajamani and Reynolds [40] have explored the preferred ionization state for both Asp32 and Asp228 in BACE-1, by using linear scaling QM calculations in which the desolvation penalties are calculated through a Poisson-Boltzmann approach. The enzyme-ligand structure had to be reduced drastically in size in order to make it amenable to this kind of calculations. The results of the QM approach favor the monoprotonated state, with the proton located in the inner oxygen of Asp228, in contradiction with the earlier MD calculations of Park and Lee [36]. Furthermore, these calculations support a neutral Asp dyad when the enzyme is ligand free. One of the shortcomings of both MD and QM calculations is that they are based on X-ray structures crystallized at pH values well above this enzyme's optimal pH (4.5). It could be argued that the ionization state would be different at the optimal catalytic pH.

Another approach, applied to the prediction of the effect of the inhibitor on the enzyme's Asp dyad charge state, is based on Poisson-Boltzmann calculations, an approach that allows the prediction of the protonation state of an ionizable residue in any pH range [41]. To test the effect of this variable on the Asp dyad actual charge Polgár and Keserü [42] have calculated the pH profile of the ionization state of these residues by an iterative Poisson-Boltzman procedure that allows for the change in charge of all buried polar residues. Interestingly enough, the results of Polgar and Keserü favor the monoprotonated state as well, but with the proton located in the Asp32 residue in both apo and holo structures, in disagreement with the calculations of Rajamani and Reynolds [40]. An important result is that the charge assignment seems to be the same for the optimal enzymatic pH and for the pH at which this enzyme was crystallized, although the difference in the ionization fractions between Asp 32 and Asp 228 is smaller at lower pH, the one in which the aspartic proteases have optimal activity [42].

The ionization state of the Asp dyad should be essential for the conformation prediction and hit enrichment in docking experiments. Several authors have used a single Asp dyad charge state as a protein template for inhibitor screening of large databases [42, 43] with contradictory results. While Polgár and Keserü [42] have shown, by using a variety of docking protocols, that their ionization assignment improves substantially the enrichment of ligands , the group of Caflisch [43] has shown that the more active compounds are scored better only when the opposite charge assignment is used [43]. Hence, the only consensus outcome provided by these studies is that the dyad possibly has a charge of -1, in line with the results for other aspartic proteases. Studies performed in our lab [44-46], and other labs [e.g., 16, 35], clearly indicate that the charge state of the active site of an AP will depend on the chemical nature of the putative ligand, and hence assuming a unique charge state for the active site of an AP when performing screening campaigns may lead to false positive or false negative leads.

II. The pH as a Probe for the Charge State of Titratable Residues

The medium acidity governs both catalytic rates and inhibition of the aspartic protease family by modulating the protonation states of the catalytic Asp dyad and other ionizable residues in the active site of the enzyme.

Hence, one of the variables used for querying the enzyme-inhibitor system about the protonation state of its ionizable functional groups is the pH value. One of the main experimental venues

for studying the effect of pH on the charge state of the enzyme relies on NMR experiments, as those that were carried out by ^{13}C-NMR studies on the complex between HIV-1 PR and pepstatin [47], DMP323 [48] and KNI-272 [49]. The results in the complex with pepstatin indicate that the catalytic carboxyls do not titrate in the pH range where the enzyme is active (pH 2.5-6.5), leading to the authors to propose that one Asp side chain is protonated and the other deprotonated. By contrast, in the absence of an inhibitor both Asp side chains are chemically equivalent, a result that brought the authors to suggest that both are deprotonated at pH 6, the optimum for enzymatic activity. However, these NMR observations in the unbound enzyme could be explained by the existence of a LBHB between the two inner Asp dyad carboxylate oxygens [32].

In the studies of the DMP323 (a cyclic urea inhibitor) binding to HIV-1 PR, several experimental techniques, which include chemical shift titrations, H/D isotope shift measurements and the X-ray crystal structure of the complex, were used to determine the pK_a values of all Asp and Glu residues in the protease/DMP323 complex [48]. The ^{13}C-NMR data obtained on a fully ^{13}C enriched sample of the protease bound to DMP323 provide strong evidence that the Asp25/125 (also referred as Asp A25/B25) carboxyl groups are protonated over the pD range 2-7, a result that is backed by the identical chemical shifts of the monomer units of the homodimer. Moreover, in the crystal structure, the Asp25/125 carboxyl side chains and inhibitor diol groups are oriented so that a hydrogen bond network having nearly ideal donor/acceptor bond angles and internuclear oxygen distances can be formed when the Asp residues are protonated, as seen in Fig. **10** [48].

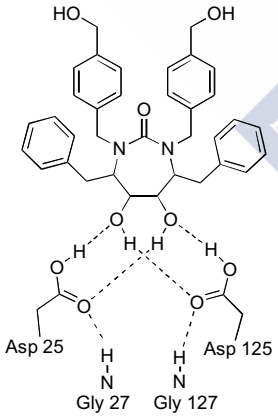


Fig. (10). Proposed network of the hydrogen bonds formed by protonated Asp25/125 carboxyl side chains and diol groups of DMP323 [48].

Unlike DMP323, KNI-272 is an assymetric HIV-1 PR inhibitor (Fig. **11**). Hence, the complex it forms with the enzyme lacks symmetry, and the two protease monomers have distinct NMR spectra. Torchia *et al*. [49] carried out an NMR titration study of the Asp carboxyls of the protease/KNI-272 complex using fully ^{13}C- and ^{15}N-labelled recombinant HIV-1PR in order to do monomer specific sequential signal assignments. The pK_a values of the aspartic acid carboxyls of the complex were determined by measuring chemical shifts of Asp C signals as a function of pD. The study provided experimental measurements of pK_a values and ionization states of all Asp carboxyls. In contrast with the carboxyls of all other Asp residues, the Cγ chemical shifts of Asp25 and Asp125 are essentially independent of pD in the range 2.5-6.2. This implies that pK_a values of both aspartic acids lie outside this range. These results are consistent with the crystal structure [50], which shows that both Asp side chains are buried by the inhibitor and not accessible

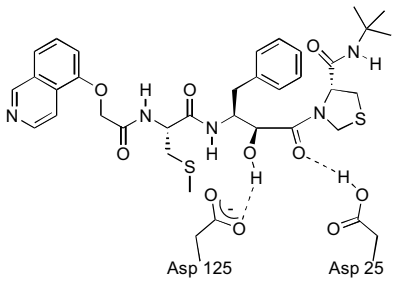


Fig. (11). Interactions between the catalytic dyad in HIV-1 PR and inhibitor KNI-272 [55].

to bulk solvent. The ionization states of the Asp carboxyl groups were determined from measurements of (a) the pD dependence of the chemical shifts of the Asp carboxyl carbons and (b) the H/D isotope effect upon the Asp carboxyl carbon chemical shifts. The results of these measurements indicate that the carboxyl of Asp25 is protonated while that of Asp125 is not protonated over the pD range from 2.5 to 6.2. The titration experiment could not be extended beyond these values because the protease/KNI-272 complex irreversibly precipitates outside this pD range. The experimental results agree with the prediction of a semi-empirical quantum mechanical calculation on the ionic states of catalytic Asp residues of the HIV-1 protease/KNI-272 complex [50]. According to the analysis, the side chain carboxyl group of Asp125 is deprotonated in order to accept two hydrogen bonds, one from a tightly bound water molecule and another from a hydroxyl group on KNI-272. Unlike Asp125, the side chain of Asp25 is protonated in order to donate a hydrogen bond to a carbonyl oxygen of KNI-272. These distinct protonation states of Asp25/125 also agree with protonation states proposed for the protease complexed with hydroxylethylene-containing inhibitors, in which one of Asp residues in the active site must be deprotonated in order to accept a hydrogen bond from the hydroxyl group of the inhibitors [51]. On the other hand, the different protonation states observed herein for the Asp25/125 contrast with experimental results obtained for the protease/DMP323 complex [48], which showed that both Asp25/ 125 carboxyl groups are protonated in the pD range extending from 2.2 to 7.0. Hence, these studies enforce the idea that the protonation states of the catalytic Asp side chains depend strongly upon specific interactions with the inhibitor and imply that knowledge of their pK_a values is required for a detailed understanding of protease/inhibitor interactions.

The effect of the pH on inhibitor binding affinity have been determined also by isothermal titration calorimetry on a variety of complexes, including endothiapepsin/pepstatin [52], plasmepsin II/pepstatin [53], and HIV-1 PR/KNI-272 [54]. In this later case, calorimetric binding experiments performed as a function of pH and utilizing buffers with different ionization enthalpies have permitted the dissection of proton linkage effects [54]. According to these experiments, the binding of the inhibitor is linked to the protonation/deprotonation of two groups and the binding affinity is maximal between pH 5 and pH 6. The analysis was consistent with the presence of two ionization sites with pK_a values of 6.0 and 4.8 in the free protein and 6.6 and 2.9 in the complex. The site that has the highest pK_a values both in the apo and in the holo state (6.0 and 6.6) is the one associated with the protonation enthalpy of a carboxylic group, strongly suggesting that this group is one of the aspartates in the aspartyl dyad. This result agrees with previous reports that one of these groups has a pK_a of aproximately 6 in the free state, and that this pK_a increases to higher values when bound to KNI-272 [41, 49].

Finally, deep insights in the active site protonation state of HIV-1 PR when bound to KNI-272 were obtained by combined

neutron crystallography at 1.9 Å resolution and X-ray crystallography at 1.4 Å resolution [55]. The resulting structural data show that the catalytic residue Asp-25 is protonated and that Asp-125 is deprotonated. The proton on Asp-25 makes a hydrogen bond with the carbonyl group of the allophenylnorstatine (Apns) group in KNI-272. The deprotonated Asp-125 binds to the hydroxyl proton of Apns (Fig. **11**).

Other studies use the pH as a probe to follow the binding affinity inhibition constant in a pH range. Figure **12** display two inhibitors (compounds **1** and **2)**, whose competitive binding with a substrate was studied as a function of the pH [16]. Neither inhibitor possesses a titratable group in the pH range 3-7 (the tertiary amine group of compound **1** would be protonated at pH $\leq$ 8). The resulting plots for the pK_i (i.e., -log(K_i)) vs. the pH values indicate radical differences amongst these compounds. For compound **1**, pK_i diminishes at decreasing pH, indicating that the two enzymatic groups which have pK_a values of 4.9 $\pm$ 0.06 and 3.1 $\pm$ 0.1 must be deprotonated for this cationic inhibitor to bind. The pK_i, profile for the uncharged inhibitor **2** peaked at around pH 4, close to the optimal pH of this enzyme. The work of this authors seems to indicate that compound **2** binds to the protease when an enzymatic group of pK_{a1} = 3.3 $\pm$ 0.1 was deprotonated and bound more tightly to the enzyme when a residue of pK_{a2} = 5.3 $\pm$ 0.09 was protonated. In summary, the cationic inhibitor **1** binds only to a form of the protease in which both of these groups are unprotonated, while the uncharged inhibitor **2** binds to this enzyme form less favorably than one which is monoprotonated. Taken as whole, these results indicate that the chemical structure of the inhibitor have a profound influence in the charge state of the ionizable residues lining the active site of AP's.

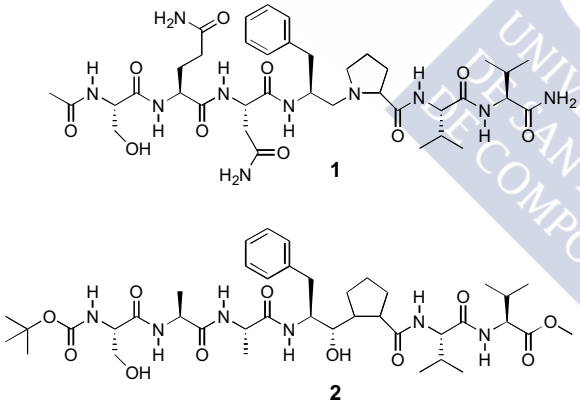


Fig. (12). Chemical structure of inhibitors **1** and **2**.

III. New Venues for Predicting Residue Charge State in Aspartic Proteases: the SPR/MM Approach

Binding assays like the ones used above [16] may have some shortcomings that originate on the competitive regime with a substrate, whose binding and catalysis may be pH dependent [44, 56]. This problem can be partially solved by using substrates that dispense with ionizable residues, as in the case of the work by Hyland *et al.* [16].

Recently, we have proposed an alternative way for predicting the pK_a values of the active site ionogenic groups in an enzyme-ligand complex that combines the experimental determination of inhibitor binding affinity at a range of pH values with a computational protocol aimed at explaining the experimental trends based on the prediction of the pK_a values for the protein and inhibitor ionogenic groups. This roadmap has been made possible by the emergence of Surface Plasmon Resonance (SPR) affinity assays and by the computer assisted techniques that allow for a fast and more reliable prediction of the ionization states of the protein groups at a given pH value. On one hand, SPR binding affinity assays avoids the recurrent problems present in FRET assays since it precludes the need for a protocol based on a competitive regime with a substrate, whose binding and catalysis may be pH dependent [56-58]. Moreover, generalized Born (GB) approaches to the solution of the Poisson Boltzmann equation have allowed faster and more accurate evaluation of the pK_a of the ionizable protein residues when the protein is bound to a given inhibitor [59, 60], a step aimed at assigning the protein residues protonation states (at a given pH value) that serves as the starting point for the molecular mechanics (MM) simulations. The conformations resulting from the MM based simulations are used to evaluate our MM/GB/SA type of scoring function and help to rationalize the SPR results [44-46].

This approach has been applied recently to probe inhibitor binding to BACE-1 [44, 45] and HIV-1 PR [46], two very important drug targets belonging to the A1 and A2 aspartic protease families respectively [1]. Our studies have allowed us to address some issues that hitherto have remained unsolved. For instance, it is known that BACE-1 is anchored to the surface of the cell, where the pH should be close to neutral. Nonetheless, the optimal catalytic pH is in the acidic range (4.5-5.5), close to the value that exists in the endosomal vehicles where is internalized by the cell. A similar picture emerges from the search for drug leads in HIV-1 PR. In this case as well, the inhibitor binding affinity to HIV-1 PR assays are performed at the optimum enzymatic pH (ca. 5.5), where the enzyme is catalytically active. However, it is possible that HIV-1 PR inhibitors may bind also at physiological pH if they are to be useful as drugs. In fact many HIV-1 PR inhibitors are less active in cell and animal assays than in the low pH tests used to screen the leads in enzyme binding assays. To bridge this disconnect we have studied the inhibitor binding affinity to both HIV-1 PR and BACE-1 by SPR biosensor technology at various pH values ranging from those present in an acidic medium to those that are close to a neutral values, which in the case of BACE-1/inhibitor complexes have been used for X-ray structural studies (i.e., 7.4).

The inhibitors used for studying the pH effect on binding affinity in BACE-1 and HIV-1 PR are listed in Tables **1** and **2** respectively. As seen from Table **1**, we have chosen for the BACE-1 study a set of inhibitors of varied chemical structure ranging from peptidic inhibitors that where discovered in early stages of the drug discovery efforts, to later generation compounds with lower peptidic contents. The HIV-1 PR inhibitors include some of the fully peptidic inhibitors like acetylpepstatin as well as some of those that are used clinically in the HAART protocol like indinavir, nelfinavir and saquinavir (Table **2**).

Effect of the Chemical Nature of the Inhibitor on the Protein Residue pK_a Values

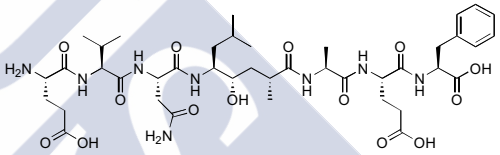
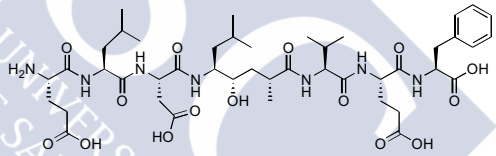
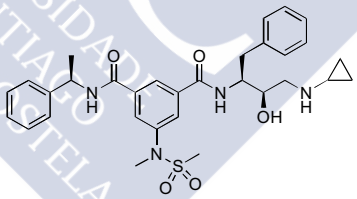
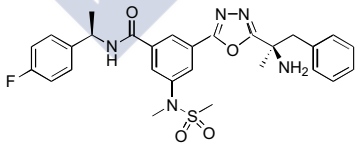
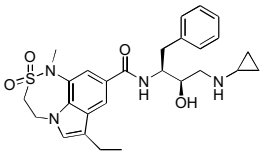
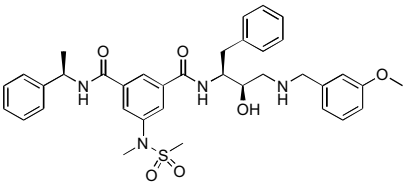
One of the most interesting results of this work is that the pK_a values of the acidic residues of the protein depend on the chemical nature of the bound inhibitor. To substantiate this issue we have calculated the tritration curves for the Asp dyad catalytic machinery of BACE-1 (Fig. **13**) and of HIV-1 PR (Fig. **14**) when bound to some of the inhibitors listed in Tables **1** and **2**. The titration curves depict the protonation fraction (X), the amount of each of the Asp dyad side chain residues that is protonated, as a function of the pH value. One of the most common features observed in the Asp titration curves of BACE-1 is that the residue Asp 32 stays protonated at a larger range of pH values than its Asp dyad partner, Asp 228. Nevertheless, the chemical structure of the inhibitor seems to have a very strong influence on the actual shape of the titration curves and specifically on the protonation fraction at the pH values we are most interested in (i.e., 4.5 and 7.4). For instance, when BACE-1 is bound to peptidic inhibitors with a hydroxyethylene (HE) group in their isostere like those in the PDB complexes 1FKN and 1M4H [61, 62], both Asp dyad partners remain protonated until pH 6, due to their large pK_a shift from their solution value (around 4.1), leading to a doubly protonated state at pH 4.5 and a mono protonated

state at pH 7.4 for the Asp dyad. On the other hand, our calculations predict that the presence of an amino group that interacts with one or both members of the Asp dyad, like in the PDB complexes 2B8L [63], 2VNN analogue [64], or 2IRZ [65], reduces their pK_a to values closer to the ones in solution (especially for the case of Asp 228). The difference between the HE based inhibitors and the latter type of ligands may reside in the fact that the ammonium group has a high pK_a value (ca. 10) and will remain charged inside the protein, providing electrostatic interactions that help to lower the Asp residues pK_a values. For this reason, the inhibitors containing hydroxylethylamine (HEA) or those containing an amino group promote a mono protonated dyad at low pH value (4.5). At a higher pH value (7.4) this effect leads to Asp dyad monoprotonated state (2B8L, 2VNN analogue) or to a fully doubly charged Asp dyad like in the case of the complex 2IRZ.

A similar picture emerges from the analysis of the HIV-1 PR titration curves. As seen from Fig. **14**, the presence of a charged fragment (like the amino group) present in nelfinavir, lowers the pK_a values of both members of the Asp dyad, as compared to those found in HIV-1 PR bound to a neutral ligand (B369).

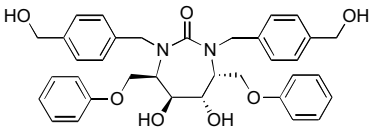
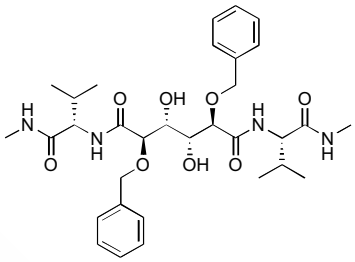
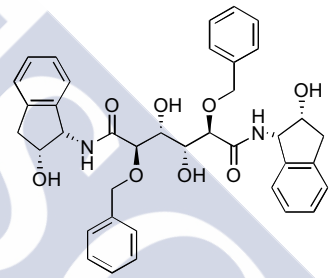
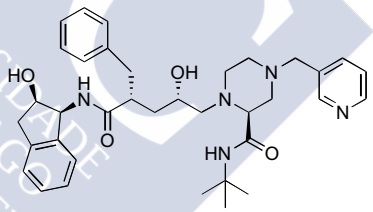
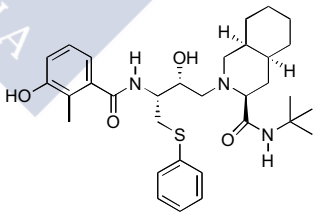
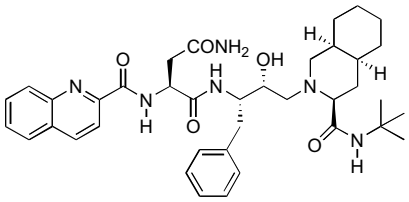
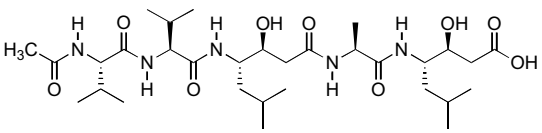
Tables **3**-**5** display the pK_a for the buried BACE-1 and HIV-1 PR acidic residues. As seen from these tables, the residues that undergo the largest upward shift in pK_a are the Asp dyad residues in both enzymes. Nevertheless, other residues display smaller but noticeable upwards or downwards pK_a shifts with respect to the values of Asp and Glu model compounds in solution. For instance, residues Glu 116, Glu 200 and Glu 339 in BACE-1 exhibit upwards shifts of around two pK_a units, for all inhibitors studied see Table **3**. Perusal of these structures indicates that the pK_a change is brought about by the burial of these residues inside the enzyme. On the other hand, residues Asp A29/B29 in all HIV-1 PR complexes display a downward shift (see Tables **4** and **5**) of more than one pK_a unit, due to their polar environment.

Table 1. BACE-1 Inhibitors Studied by our SPR/MM Approach

PDB code	Name	Chemical structure
1FKN	**OM99-2 (I-1)**	
1M4H	**OM00-3 (I-2)**	
2B8L	**I-3**	
2IRZ	**I-4**	
2VNN[a]	**I-5**	
2VKM	**I-6**	

[a] 2VNN analogue

Table 2. HIV-1 PR Inhibitors Studied by our SPR/MM Approach

PDB code	Name	Chemical Structure
1AJX[a]	A008	
1EBW	B268	
1EBY	B369	
1SDV	Indinavir	
3EKX	Nelfinavir	
2NMW	Saquinavir	
5HVP	Acetylpepstatin	

[a] 1AJX analogue

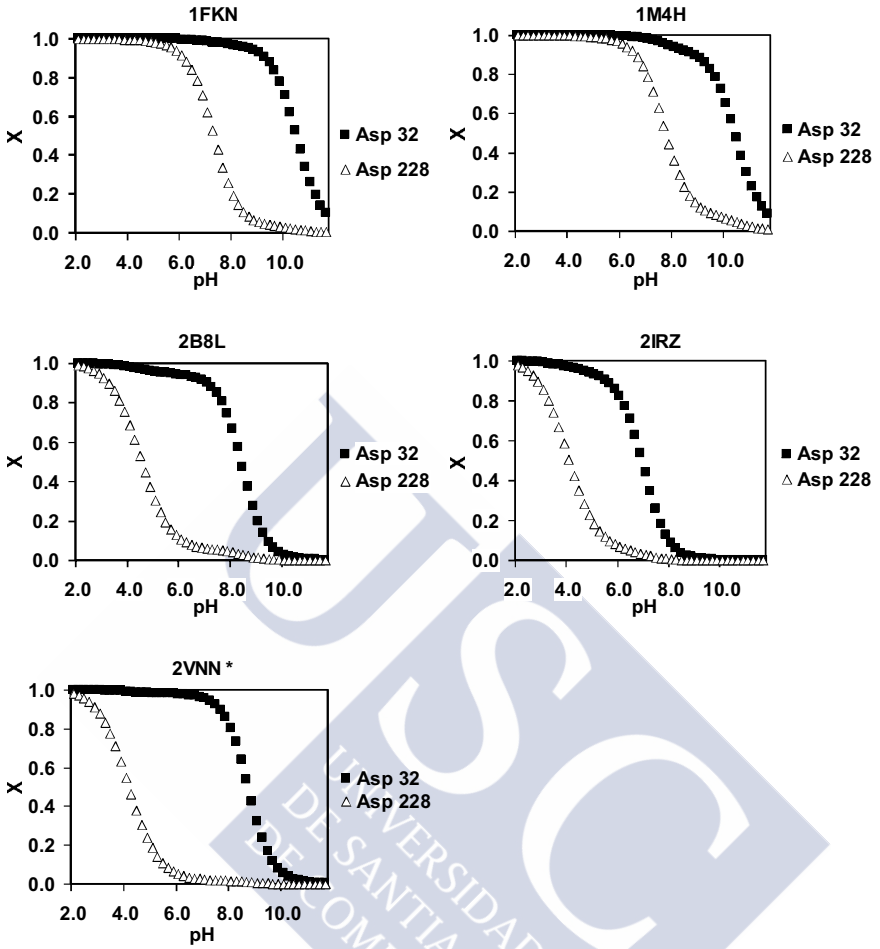


Fig. (13). Titration curves for the catalytic Asp dyad residues of BACE-1 complexes.

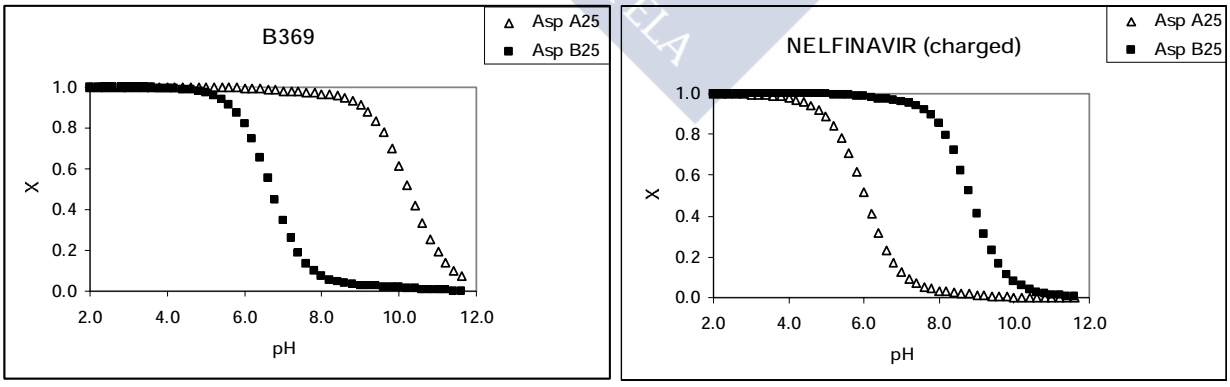


Fig. (14). Titration curves for the catalytic Asp dyad residues of HIV-1 PR complexes with inhibitors B369 and nelfinavir.

On the Charge State of the Asp Dyad in BACE-1 and HIV-1 PR: A Case for Enzyme-Inhibitor LBHB's

The catalytic Asp dyad residues are a special case, since they are deeply buried, but in a polar environment which provides a network of hydrogen bonds amongst them and with other functional groups of the inhibitor and the protein residues. Hence, the pK_a increase upon inhibitor binding predicted for the Asp dyad by our protocol is rather intriguing, and in some cases it may be seem at variance with some experimental results. For instance, our results indicate that the Asp dyad will only be in the monoprotonated state at the highest pH (7.4), while some experimental results, like those obtained by NMR, support a single charged Asp dyad over a wider

Table 3. pK_a Values for Buried Residues in BACE-1/Inhibitor Complexes

Residue[a]	PDB code				
	1FKN	1M4H	2B8L	2IRZ	2VNN[b]
Asp 32	10.46	10.35	8.35	6.88	8.67
Asp 83	4.49	4.74	4.79	4.87	4.83
Asp 138	2.98	3.11	3.23	3.38	3.41
Asp 228	7.26	7.68	4.47	4.01	4.11
Asp 311	3.04	3.53	3.88	3.59	3.62
Asp 346	4.46	4.46	4.55	4.59	4.49
Asp 363	3.34	3.25	3.08	3.06	3.24
Glu 116	5.66	6.07	5.95	6.09	5.80
Glu 200	5.95	5.63	5.50	5.52	5.43
Glu 207	4.79	4.67	5.02	5.02	4.60
Glu 219	4.40	4.38	4.06	4.61	4.57
Glu 339	6.72	6.73	6.10	6.26	6.44

[a]The pK_a value for Asp and Glu residues in solution are 3.9 and 4.2, respectively. The two catalytic residues are Asp 32 and Asp 228.
[b]2VNN analogue

Table 4. Predicted pK_a Values for Acidic Residues in HIV-1 PR when Bound to Neutral Inhibitors

Residue	A008	B268	B369
Asp A25	8.64	10.23	10.24
Asp A29	2.77	3.01	3.51
Asp A30	4.78	4.06	4.08
Asp A60	3.66	3.50	3.60
Asp B25	7.40	6.91	6.70
Asp B29	2.49	3.02	3.84
Asp B30	4.12	3.91	3.69
Asp B60	2.77	3.60	3.47
Glu A21	4.41	4.30	4.25
Glu A34	4.82	5.17	5.23
Glu A35	4.18	4.13	4.15
Glu A65	3.73	3.67	3.65
Glu B21	4.46	4.26	4.26
Glu B34	5.01	5.01	4.98
Glu B35	3.79	3.77	3.95
Glu B65	3.87	3.80	3.77

range of pH values. The NMR experimental support for the mono-protonated state was obtained from the analysis of ^{13}C NMR data of the complex between HIV-1 PR and pepstatin [47], which exhibits two distinct signals at 172.4 and 178.8 ppm that remain unchanged in the pH range between 2.5 and 6.5, thus indicating that the Asp dyad protonation state does not change in this pH range. Of the two peaks, the one at low field one is the only one that undergoes an isotopic shift. Nevertheless, these NMR results for the HIV-1 PR/acetylpepstatin complex seem to be amenable to more than one interpretation. Piana *et al*. [66] proposed a diprotonated Asp dyad

Table 5. Predicted pK_a Values for Acidic Residues in HIV-1 PR when Bound to Inhibitors with Titratable Groups

Residue	Indinavir		Nelfinavir		Saquinavir		Ac-pepstatin	
	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]	Charged[a]	Neutral[b]
Asp A25	7.21	7.29	6.15	7.36	5.61	6.56	8.67	8.77
Asp A29	2.19	2.42	2.10	2.23	2.84	2.94	2.79	2.80
Asp A30	3.66	3.76	4.40	4.75	4.29	4.37	4.74	4.75
Asp A60	3.42	3.44	3.09	3.11	3.52	3.53	3.46	3.46
Asp B25	9.41	9.57	8.89	9.85	8.03	8.74	7.30	7.41
Asp B29	3.35	3.51	2.11	2.32	2.31	2.52	2.37	3.30
Asp B30	4.56	4.60	3.94	4.08	4.02	4.15	3.88	5.04
Asp B60	3.36	3.37	3.24	3.25	3.01	3.03	3.69	3.72
Glu A21	4.26	4.29	4.38	4.41	4.62	4.63	4.81	4.83
Glu A34	4.32	4.35	4.98	5.05	5.02	5.41	5.31	5.35
Glu A35	4.23	4.25	3.68	3.71	3.74	3.76	4.14	4.15
Glu A65	3.67	3.67	3.58	3.60	3.54	3.55	4.09	4.09
Glu B21	4.47	4.52	4.53	4.55	4.09	4.12	4.95	4.95
Glu B34	4.72	4.83	5.07	5.11	5.20	5.25	4.85	4.86
Glu B35	3.65	3.68	3.97	4.00	4.23	4.25	3.72	3.74
Glu B65	3.83	3.85	3.56	3.57	3.75	3.76	3.46	3.47

[a] Inhibitor in the singly charged state.
[b] Inhibitor in the neutral state.

based on an *ab-initio* molecular dynamics assignment that includes the calculation of ^{13}C chemical shifts and isotopic shifts. In their work, they show that the only Asp dyad charged state that reproduces these NMR observables is the neutral one, in agreement with our predictions. In the case of the HIV-1 PR/DMP323 complex, our calculations [46] reproduce quite well the protonation state assignment for all acidic residues obtained by NMR experiments [48]. Nevertheless, for other inhibitors, like KNI-272, recent results of a high resolution X-ray structure, together with a neutron diffraction study [55] display the existence of densities only next to the oxygen of one of the Asp residues in the Asp dyad, implying the existence of a monoprotonated assignment for this system.

For the HIV-1 PR, the results shown here support the possibility that the Asp dyad charge state is neutral at the pH value at which this enzyme is most active (e.g., 4.5-6), since the pK_a values of their Asp residues are for the most part above 6. As seen from Tables **4** and **5**, the dyad monoprotonated state is only prevalent at the highest pH value (7.4) when HIV-1 PR is bound to inhibitors B268, B369, indinavir, nelfinavir and saquinavir. Similar results were obtained for BACE-1 peptidic inhibitors containing a hydroxyethylene moiety [44, 45]. The only HIV-1 PR complex where the Asp dyad becomes monoprotonated at the lowest pH (5.6) is the one formed with saquinavir, when this ligand is protonated see Table **5**.

We propose a possible explanation for this outcome based on the existence of a LBHB between the hydroxyl group located on the inhibitor's isostere and the oxygen of the carboxylate groups that belong to the Asp dyad (see below). One of the defining characteristics for a LBHB is the existence of a very short hydrogen bond distance between donor and acceptor [29, 67]. Already, in some of the earliest crystallographic structures of HIV-1 PR complexes (e.g., HIV-1 PR bound to acetylpepstatin) it was observed that the distance from the hydroxyl oxygen of the inhibitor to one of the oxygens of the side chain of an Asp dyad member could be as short as 2.2 Å [68], raising the possibility of a low barrier hydrogen bond between these two atoms.

The existence of compact hydrogen bonds, that provides evidence for LBHB's, have been confirmed as well by atomic resolution X-ray and neutron diffraction studies of ligand bound aspartic proteases, like in endothiapepsin [27], suggesting that LBHB's may be a common feature for some aspartic protease-inhibitor complexes. It has been posited that in LBHB's, the proton that mediates the HB could undergo tunnelling, from the energy-well located next to hydroxyl oxygen of the inhibitor to the one next to the carboxylate oxygen [67]. In such a system the proton could be found at both positions (see Fig. **15**, panel **B**), resulting in the dispersion of the negative charge of the Asp residue. It may be argued that the tunnelling in the LBHB populates the Asp dyad diprotonated state, and hence it may be claimed that this charged state could be a molecular mechanics compromise representation of the entities implied by LBHB (Fig. **15**).

Evaluating Binding Affinities at Different pH Values

The comparison of the calculated pH effect upon binding with the experimental one provides a testing ground for validating our pK_a predictions listed in Tables **3**-**5**. The structures with the protein residue charge assignment at a given pH (based on these pK_a values) serve as the input for the evaluation of the inhibitor binding scoring function:

$$< G_{bind}>= <\Delta G_{mm}(P:L) - G_{mm}(P)-\Delta G_{mm}(L) + G_{gb}(P:L) - \Delta G_{gb}(P) - \Delta G_{gb}(L)> \quad (1)$$

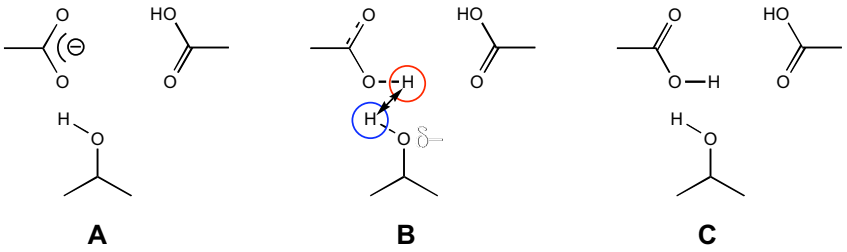


Fig. (15). (**A**) and (**C**) represent two of the three possible protonation states (mono- and di-protonated) for the Asp dyad, (**B**) is a schematic representation of a LBHB with the possible proton positions enclosed by circles.

Where G_{mm} and ΔG_{gb} indicate the molecular mechanics CHARMM force-field [69] and the GBSW solvation [59] components respectively, for the protein-ligand complex (P:L), protein (P) and ligand (L).

Whenever the pH falls very close to the pK_a value of a AP acidic residue, both neutral and charged species are equally populated. Hence, additional structures with the alternative protonation states are needed in order to evaluate our scoring function. When this situation arises the final binding scoring function was obtained through a weighted binding scoring function for both protonation states.

$$\Delta G_{bind} = X_1 \cdot \Delta G_{bind}(0) + (1\text{-}X_1) \cdot G_{bind}(-1) \quad (2)$$

Where $\Delta G_{bind}(0)$ and $\Delta G_{bind}(-1)$ are the scoring function values when an acidic residue is protonated or charged respectively. X_1 is the protonation fraction for a specific residue, obtained from its pK_a value through the Henderson-Hasselbalch equation for a given pH. Detailed methodological aspects of this work can be found in references 44-46.

Below we review some of the insights gained by these calculations for BACE-1 and for HIV-1 PR.

a). Results for BACE-1

Table **6** lists the dissociation constants (K_D) obtained by SPR-biosensor experiments, together with the results of the affinity scoring at both pH values calculated from equation 1. The energy values in this table were the result of an average over the 100 conformations with the lowest scoring function values. Values in parenthesis refer to the weighted scoring function, when the fraction of the protonated state for this residue is very close to 0.5.

As seen from this table, our scoring function reproduces the ranking of binding for every inhibitor upon a pH increase. For instance, our calculations show that the ligands that contain an isostere with a hydroethylene motif are predicted to have their highest affinity for the protein at the pH value at which the enzyme has the highest catalytic activity (4.5), in agreement with the observed affinities. This trend stands to reason since the isosteres in these inhibitors (OM99-2 and OM00-3) are transition state analogues and their ligand binding affinity ranking upon pH change should mimic that of the pH dependence of substrate binding. When the anchoring motif to the Asp dyad is an amino group, this trend inverts and the highest affinity is observed at pH 7.4, also in agreement with experiment. The rationale behind this behaviour could be possibly found in the charged nature of the amino group, which has a pK_a of around 10 in solution, and would likely remain protonated inside the protein and induce the ionization of the Asp dyad, resulting in the formation of a salt bridge between both charged groups, and hence raising the affinity of the ligand for the protein at this pH value. The K_D values obtained from SPR-biosensor experiments indicate that those inhibitors with a mixed isostere's anchoring motif (i.e., those with a hydroxylethylamine motif) have a mixed behavior regarding the optimal pH for inhibitor binding to the protein, a trend that is predicted by our scoring function calculations as well. As can be seen from Table **6** compound **I-5** shows almost equal K_D at both pH values, while compound **I-3** has a higher affinity for the enzyme at higher pH. In the case of the 2B8L complex, the resulting binding affinity pH dependence could be traced back at least in part to the Asp dyad possible multiple protonation state. While the Asp 32 has a predicted pK_a value of 8.4 and hence will remain protonated at both pH values, the other member of the Asp dyad (Asp 228) has a pK_a value only slightly lower than 4.5 see Table **3**, which will result in an almost equal population of charged and uncharged species at the lower pH. In this case we have performed a weighted binding affinity prediction as described above.

Since aspartic proteases generally present their highest activity at acidic pH values, it is believed that they act in cell compartments where the pH is low. Nevertheless, BACE-1 is found at the cell surface where pH is neutral. As seen from Table **6**, the cell assays performed in our group indicate that those inhibitors that have a high enzyme affinity both at high and low pH values (i.e., those inhibitors with a HEA moiety) also show high activity at cellular level. Furthermore, it was found recently that some BACE-1inhibitors based on aminoheterocyclic fragments have a good cell activity in the low µM range and similar enzyme affinities at both acidic and close to neutral pH (6.5) [70]. A possible explanation for these results is that although BACE-1 is catalytically active once transported to endosomal vesicles where the pH is acidic, only compounds that also interact with the enzyme at neutral pH will be co-transported with the enzyme into this compartment. Hence, compounds that bind BACE-1 at acidic as well as neutral pH values could in principle be good candidates for optimal performance at cellular level, a design avenue for cell active compounds which could be explored for a larger number of compounds. The results presented here indicate that our computer assisted protocols for the evaluation of the pH dependence could be ideally suited to assist in the design of cell active analogues.

b). Results for HIV-1 PR

Table **7** displays the SPR based binding free energies as well as the scoring function values for each inhibitor at the three pH values (4.1, 5.1 and 7.4) used in our studies. As in the case of BACE-1, both the protonated and the charged state of an acidic residue contribute to the binding affinity score when its pK_a falls very close to the pH value. For instance, as seen from Table **4**, when HIV-1 PR is bound to inhibitor B369, the calculated pK_a value for residue Asp A30 is 4.08, leading to almost equal populations of ionized and neutral charged states for this residue at pH 4.1. Another example relates to the Asp dyad residues, which exhibits large pK_a shifts to values that are more typical for basic residues. In some cases (indinavir, nelfinavir) their pK_a values are close to the highest pH value studied (7.4), resulting also in similar populations at both charged states for the Asp A25 residue. Taking into account both charged states in our binding affinity calculation improves in some cases the binding ranking affinity agreement with experimental results (see Table **7**).

Table 6. Cell assay Data and pH Effect on Experimental and Calculated Affinity Values

PDB code	Inhibitor	Cellular [b] IC_{50} (nM)	K_D (nM)[c]		Scoring function (kcal/mol)[d]	
			pH 4.5	pH 7.4	pH 4.5	pH 7.4
1FKN	**OM99-2 (I-1)**	940	< 10	617 ± 2.8	-65.0 ± 3.4	-57.2 ± 3.1 (-55.0 ± 3.3)
1M4H	**OM00-3 (I-2)**	----	<10	171±19	-71.4 ± 2.8	-53.0 ± 3.4 (-53.1 ± 3.3)
2B8L	**I-3**	22	93 ± 17	16 ± 3	-59.8 ± 3.3 (-58.4 ± 3.3)	-61.0 ± 3.0
2IRZ	**I-4**	86	105 ± 34	42 ± 20	-45.8 ± 3.8	-53.2 ± 2.4
2VNN[a]	**I-5**	3	4 ± 0.3	5 ± 0.8	-45.2 ± 3.6	-45.5 ± 3.9
2VKM	**I-6**	0.1	< 10	< 10	----	-----

[a]2VNN analogue
[b]Inhibition of A -production in HEK293 cells stably transfected with Swedish mutant APP
[c]The standard deviations are based on at least 2 independent experiments.
[d]Values in parenthesis were calculated by weighting the affinities with their protonation fraction states when those values are close to 0.5

The protonation fraction value (at a given pH) of the ionizable groups belonging to the inhibitors studied here also influence the binding affinity of the inhibitor. For instance, indinavir, nelfinavir and saquinavir have at least one amino group with a pK_a above 7. Nevertheless, perusal of the active site in the ligand-protein structures indicates that the inhibitors' amino groups do not form hydrogen bonds or direct ion pairs with any protein polar groups. This raises the possibility that the protonated amino group's pK_a value in these inhibitors would be lower than the ones predicted in solution, leading to a neutral ligand at lower pH value (when bound) than in solution. In order to search for the actual amino group protonation state in these inhibitors we have calculated the scoring function binding affinity for both the neutral and protonated states. In the case of nelfinavir, the scoring function results that rank binding affinities better are the result of neutralizing the amino group at pH above or around 5.1. This outcome supports the notion that the pK_a value for the most basic protonated amino group is around this value and suggests a possible explanation for the increase in binding affinity when the pH rises to 5.1. The neutralization of the ligand at pH 5.1 generates a more hydrophobic molecule with a lower desolvation penalty (results not shown), a result that favors binding to the enzyme.

As seen from Table **7**, when both the multiple protonation states of the protein residues and the inhibitor protonation state change at a given pH are taken into account, there is a fair correlation between the observed and calculated binding affinity trends, upon a change in pH.

The results described here raise the possibility of designing inhibitors with different affinity pH dependences. For instance, we predict that replacement of the C-terminal carboxylate group in acetylpepstatin by a polar non-charged group like an amide, may lead to an increase (rather than a decrease) in affinity when the pH rises from 5.1 to 7.4 (see Table **7**).

The experimental affinity trends amongst inhibitors, at a given pH value, are not as well reproduced as those related to an increase in pH (see Table **7**). This may be related to the conformational entropy penalty contributions from inhibitors that have substantial structural differences. For instance, Ac-pepstatin is predicted to have a higher affinity than A008, in contrast to the experimental trend (see Table **7**). Perusal of the chemical structures indicate that the former inhibitor has a peptidic nature and has many more degrees of freedom than A008 and hence should 'pay' a much higher entropic penalty upon binding to the enzyme. Including the conformational entropic terms should bring the predicted ranking more in line with experiment.

IV. Effect of the Ligand and Active Site Residues Charges on Pose Identification and Hit Screening Campaigns

The studies described in previous sections that have been carried out in our lab [44-46] and others [16,35] clearly demonstrated that each inhibitor (when bound to an AP enzyme) promotes an unique charge state in the active site ionogenic residues at a given pH value. Moreover, our combined SPR/MM studies on both BACE-1 and HIV-1 PR reviewed above clearly indicate that the binding affinity trends upon a pH change depend ultimately on the polar groups located close to the catalytic dyad (i.e., the fragment that directly binds to the Asp dyad, like the isostere in peptidomimetic inhibitors). As seen from our calculations, inhibitors that have isosteres with similar polar groups will induce analogous charge states of the protein ionogenic residues. As a result, it will be expected that the correct pose identification and the screening enrichment in docking based hit campaign searches will depend substantially on predicting the correct pK_a values of the acidic residues lining up the active site. Hence, predicting charge state for the titratable residues in the active site of AP's ahead of docking experiments should improve their outcome. In this regard, classifying the putative binders according to the fragment that is expected to bind to the Asp dyad should be a useful step.

Much of the recent work on this issue has been carried out on BACE-1 [40,42,43,71-73], the AP therapeutic target that has attracted most attention recently. For instance, Barman & Prabhakar have performed self-docking calculations on a set of chemical diverse inhibitors, using as protein templates the cognate protein structures with eight of the possible Asp dyad protonation states [72]. Interestingly enough, inhibitors bearing a HE type isostere (see Fig. **3**) found a pose with RMSD < 2.0 when the dyad was either mono-protonated or di-protonated, indicating that both protonation states could be present in the BACE-1 bound to HE based inhibitors like OM99-2 or OM003 (see Table **1**), very much in line with the predictions based on our combination of SPR experiments and MM calculations discussed above [44, 45]. Previously, Rajamani & Reynolds [40] also found (by QM calculations) that at low

Table 7. Effect of pH on Experimental and Calculated Affinity Values

Inhibitor	Scoring function (kcal/mol)[a]			K_D (nM)		
	pH 4.1[b]	pH 5.1	pH 7.4[c]	pH 4.1	pH 5.1	pH 7.4
A008	-79.85 **(-79.98)**	**-80.18**	**-78.75**	1.83	1.84	6.95
B268	**-87.22**	**-87.46**	**-85.50**	2.97	3.00	10.80
B369	-99.93 **(-101.35)**	**-101.42**	**-99.69**	1.14	1.00	13.90
Indinavir			-100.76 **(-92.82)**	5.45	1.38	1.20
Indinavir (+)	**-88.55**	**-91.96**	(-92.82)			
Nelfinavir		**-91.5**	-90.70 **(-90.80)**	37.6	2.99	3.40
Nelfinavir (+)	**-88.55**	-89.12	-92.80			
Saquinavir		**-92.38**	**-96.23**	4.13	0.637	0.577
Saquinavir(+)	**-91.44**	-92.49	-94.89			
Acpepst	**-95.73**	-88.80	-94.2 (-95.0)	208	759	8150
Acpepst (-)	--	**-92.17**	**-91.84**			

[a]Bold numbers indicate the protonation states that have similar trends to the experimental.
[b]Values in parentheses were calculated by weighting the affinities obtained by taking into account both protonation states for the residue Asp30.
[c]Values in parentheses were calculated by weighting the affinities obtained by taking into account both protonation states for the residue Asp25.

pH the diprotonated state could be populated in the BACE-1/OM99-2 complex.

As mentioned above, we predict that the actual pK_a values of the ionizable groups in the inhibitor play a crucial role in predicting the effect of the pH on binding affinity. This outcome may seem at odds with some of the results of the work of Polgar *et al*. [71], who performed a thorough structure based virtual screen to investigate the impact of ligand protonation on screening efficiency. They found that a scoring function that only includes the protein-ligand van der Waals term, neglecting electrostatic interactions altogether, produced the largest enrichment in docking based screenings [71].

Most recently, Kacker *et al*. [73] combined MD simulations with QM calculations into a protocol for the prediction of the Asp dyad protonation state in a number of BACE-1/inhibitor complexes to explore self-docking, cross-docking and virtual ligand screening. Unfortunately, they only allowed Asp dyads with mono-protonated or di-anionic charge states, precluding the possibility of comparing their results with those of our studies [44,45].

CONCLUSION

In the present work we reviewed the effect of the protonation states of the titratable residues in AP's catalysis and inhibition in these enzymes.

In the first section we discussed the catalytic mechanism in both the eukaryotic and viral AP's. In general, the acid driven catalysis requires that one of the members of the Asp dyad would be ionized in order to activate the water molecule for the nucleophilic attack, while the second member needs to be protonated in order to enhance the electrophilic nature of the substrate carbonyl group (see Scheme **1**). Although, as expected, there are many similarities in the catalytic pathway for both A1 and A2 families of enzymes, some of the experimental observations and computational chemistry calculations indicate clear differences in their mechanism of action. While in the retroviral A2 family binding of the substrate induces the mono-ion charge state for the Asp dyad, in the A1family this charge state seems to be already present in the unbound state of the proteins.

The crystallographic work at atomic resolution together with neutron diffraction studies of AP's has shed much light on the reaction mechanism. Nevertheless, there are many issues left open. For instance, in one of the most appealing proposals, LBHB's were postulated as an essential part in every step of the reaction mechanism [31]. Catalytic rate enhancement in AP's could be explained in part by the lowering of the barrier for proton transfer in a hydrogen bond from donor to acceptor, which is a typical feature of LBHB's. The experimental support for this type of bonds is rather scarce. Most of it supports short HB between inhibitor hydroxyl groups and carboxyl oxygen of one of the members of the Asp dyad. Short distances between the inner oxygens of the Asp catalytic dyad have been found in HIV-1 PR complexes, and the shortest (2.30 Å) when this enzyme is bound to reaction products [74].

The design of highly potent AP inhibitors, that could be the basis for drug leads require a deep knowledge of the protonation state of the active site residues induced by their presence. This vital issue has been tackled by experimental techniques like NMR, X-ray crystallography, calorimetric and binding kinetic techniques. In many studies, the pH dependence of some observables (as the NMR chemical shift, or the FRET binding affinity) was used to shed some light on the charge state of the titratable residues. Many types of calculations aimed mostly at elucidating the Asp dyad charged state when the enzyme is bound to an inhibitor were also carried out by MD, QM or Poisson Boltzmann type calculations. Recently, we have developed a protocol that combines monitoring the pH effect on binding affinities by SPR methods and rationalization of the results by MM based calculations. We have used this combined

method on BACE-1 and HIV-1 PR, two important therapeutic targets. Our calculations are able to reproduce the inhibitor binding trends to either enzyme upon a pH increase. The results indicate that inhibitors that differ in the Asp dyad anchoring fragments will present different binding affinity trends upon a pH increase. Our calculations have enabled us to predict the protonation states at different pH values that underlie the above mentioned trends. We have found out that these results have many implications not only for *in silico* hit screening campaigns aimed at finding high affinity binders, but also (in the case of BACE-1) for the discovery of cell active compounds. Recently, there has been a flurry of docking calculations in BACE-1, performed with a variety of Asp dyad protonation states, aimed at including the best performing Asp dyad protonation states in screening campaigns [72, 73]. Specifically, Barman & Prabhakar [72] found out that the use of different Asp dyad protonation states could lead to ligand posses that are close to the experimentally observed conformations. Some of the Asp dyad protonation states that resulted from this research are in line with our predictions. For instance, in the case of HE inhibitors, the binding pose could be reproduced by a neutral Asp dyad, in agreement with our SPR/MM results [44, 45].

Some of the above studies [73] have aimed at finding a protonation state that could both identify the correct binding poses (in self- or cross-docking experiments), and at the same time generate substantial enrichments when screening putative ligands. One possible hurdle for this dual track aim lies in the different experimental conditions needed for experimental binding affinity assays and the X-ray structure experiments that allows ligand pose identification. For instance, in the case of BACE-1, most of the binding assays are performed at the enzyme's optimal pH (4.5-5.5), while the crystal structures studies are performed at a pH close to neutral (6.5-7.4). Hence, rather than assigning a single protonation state to be used both for pose validation and virtual ligand screening, it would be desirable to calculate the titration curves for these residues (as shown in Figs. **13** and **14**) and hence the protonation state at any pH value, as a starting point for pose prediction and virtual ligand screening campaigns.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), Swedish Research Council, Xunta de Galicia, and Universidad de Santiago de Compostela, for financial support.

ABBREVIATIONS

HIV	=	Human immunodeficiency virus
AP	=	Aspartic protease
HAART	=	Highly active antiretroviral therapy
AIDS	=	Acquired immunodeficiency syndrome
BACE	=	β-site APP cleaving enzyme
HIV-1 PR	=	Human immunodeficiency virus type 1 protease
HB	=	Hydrogen bond
LBHB	=	Low barrier hydrogen bond
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
MD	=	Molecular dynamics
AD	=	Alzheimer's disease
QM	=	Quantum mechanical
SPR	=	Surface plasmon resonance
FRET	=	Fluorescence resonance energy transfer
GB	=	Generalized Born
MM	=	Molecular mechanics
SA	=	Solvent accessibility
HE	=	Hydroxyethylene
HEA	=	Hydroxylethylamine
CHARMM	=	Chemistry at Harvard molecular mechanics
GBSW	=	Generalized Born with simple switching

REFERENCES

[1] Ghosh AK, Ed. Aspartic acid proteases as therapeutic targets. Weinheim: Wiley-VCH 2010.

[2] Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondu-Lassis M, Laurent-MathaV, Prébois C, Rochefort H, Vignon F. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. Cancer Lett 2006; 237: 167-179.

[3] Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. Clin Chim Acta 2000; 291: 157-170.

[4] Braga-Silva LA, Santos AL. Aspartic protease inhibitors as potential anti-Candida albicans drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. Curr Med Chem 2011; 18: 2401-2419.

[5] Boss C, Corminboeuf O, Grisostomi C, Weller T. Inhibitors of aspartic proteases - potential antimalarial agents. Expert Opin Ther Pat 2006; 16: 295-317.

[6] Villaverde MC, González-Louro L, Sussman F. The search for drug leads targeted to the β-secretase: an example of the roles of computer assisted approaches in drug discovery. Curr Top Med Chem 2007; 7: 980-990

[7] Holloway, MK, Hunt P, McGaughey GB. Structure and modeling in the design of β- and γ-secretase inhibitors. Drug Dev Res 2009; 70: 70-93.

[8] Meyers MJ, Goldberg DE. Recent advances in plasmepsin medicinal chemistry and implications for future antimalarial drug discovery efforts. Curr Top Med Chem 2012; 12: 445-455.

[9] Dunn BM, Ed. Structure and function of the aspartic proteinases. New York: Plenum Press 1991.

[10] James MNG, Ed. Aspartic proteinases: retroviral and cellular enzymes. New York: Plenum Press 1998.

[11] Varghese J, Ed. BACE: Lead target for orchestrated therapy of Alzheimer's disease. Weinheim: Wiley-VCH 2010.

[12] Weir MR. Renin inhibitors: novel agents for renoprotection or a better angiotensin receptor blocker for blood pressure lowering? Curr Opin Nephrol Hypertens 2007; 16: 416-421.

[13] Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 2012; 40: D343-350. Available from: http://merops.sanger.ac.uk/

[14] Northrop JH. Crystalline pepsin. I. Isolation and tests of purity. J Gen Physiol 1930; 13: 739-766.

[15] Bugg TDH. Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. 2nd ed. Oxford: Blackwell 2004.

[16] Hyland LJ, Tomaszek Jr TA, Meek TD. Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism. Biochemistry 1991; 30: 8454-8463.

[17] Andreeva NS, Rumsh LD. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. Protein Sci 2001; 10: 2439-2450.

[18] Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M, Takeuchi T. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. J Antibiot. (Tokyo) 1970; 23: 259-262.

[19] Veerapandian B, Cooper JB, Sali A, Blundell, TL, Rosati RL, Dominy BW, Damon DB, Hoover DJ. Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases. Protein Sci 1992; 1: 322-328.

[20] James MNG, Sielecki AR, Hayakawa K, Gelb MH. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine- and difluorostatone-containing peptides. Biochemistry 1992; 31: 3872-3886.

[21] Silva AM, Cachau RE, Sham HL, Erickson JW. Inhibition and catalytic mechanism of HIV-1 aspartic protease. J Mol Biol 1996; 255: 321-346.

[22] Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD, Davies DR. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from Rhizopus chinensis: Implications for a mechanism of action. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7009-7013.

[23] Mantafounis D, Pitts J. Protein engineering of chymosin; modification of the optimum pH of enzyme catalysis. Protein Eng 1990; 3: 605-609.

[24] Coates L, Erskine PT, Wood SP, Myles DAA, Cooper J. A neutron laue diffraction study of endothiapepsin: implications for the aspartic proteinase mechanism. Biochemistry 2001; 40: 13149-13157.

[25] Coates L, Erskine PT, Crump MP, Wood SP, Cooper J. Five atomic resolution structures of endothiapepsin inhibitor complexes: implications for the aspartic proteinase mechanism. J Mol Biol 2002; 318: 1405-1415.

[26] Erskine PT, Coates L, Mall S, Gill RS, Wood SP, Myles DAA, Cooper J. Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. Protein Sci 2003; 12: 1741-1749.

[27] Coates L, Tuan HF, Tomanicek S, Kovalevsky A, Mustyakimov M, Erskine P, Cooper J. The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction. J Am Chem Soc 2008; 130: 7235-7237.

[28] Fujimoto Z, Fujii Y, Kaneko S, Kobayashi H, Mizuno H. Crystal structure of aspartic proteinase from Irpex lacteus in complex with inhibitor pepstatin. J Mol Biol 2004; 341: 1227-1235.

[29] Cleland WW, Frey PA, Gerlt JA. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. J Biol Chem 1998; 273: 25529–25532.

[30] Coates L, Erskine PT, Mall S, Gill R, Wood SP, Myles DAA, Cooper J. X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases. Eur Biophys J 2006; 35: 559-566.

[31] Northrop DB. Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanism of the aspartic proteases. Acc Chem Res 2001; 34: 790-797.

[32] Piana S, Carloni P. Conformational flexibility of the catalytic Asp dyad in HIV-1 protease: an *ab initio* study on the free enzyme. Proteins: Struct Funct Genet 2000; 39: 26-36.

[33] Hosur MV, Bhat TN, Kempf DJ, Baldwin ET, Liu B, Gulnik S, Wideburg NE, Norbeck DW, Appelt K, Erickson JW. Influence of stereochemistry on activity and binding modes for C_2 symmetry-based diol inhibitors of HIV-1 protease. J Am Chem Soc 1994;116: 847-855.

[34] Andreeva NS. Special features of the three-dimensional structure defining properties of aspartic proteases. Russ J Bioorg. Chem 2003; 29: 411-414.

[35] Harte Jr WE, Beveridge DL. Prediction of the protonation state of the active site aspartyl residues in HIV-1 protease-inhibitor complexes via molecular dynamics simulation. J Am Chem Soc 1993; 115: 3883-3886.

[36] Park H, Lee S. Determination of the active site protonation state of β-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design. J Am Chem Soc 2003; 125: 16416-16422.

[37] Friedman R, Caflisch A.The protonation state of the catalytic aspartates in plasmepsin II. FEBS Letters 2007; 581: 4120–4124.

[38] Rao BG, Singh UC. Studies on the binding of pepstatin and its derivatives to *Rhizopus* pepsin by quantum mechanics, molecular mechanics, and free energy perturbation methods. J Am Chem Soc 1991; 113: 6735-6750.

[39] Yu N, Hayik SA, Wang B, Liao N, Reynolds CH, Merz Jr KM. Assigning the protonation states of the key aspartetes in β-secretase using QM/MM X-ray structure refinement. J Chem Theory Comput 2006; 2: 1057-1069.

[40] Rajamani R, Reynolds CH. Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β-secretase, J Med Chem 2004; 47: 5159-5166.

[41] Trylska J, Antosiewicz J, Geller M, Hodge CN, Klabe RM, Head MS, Gilson MK.Thermodynamic linkage between the binding of protons an inhibitors to HIV-1 protease. Protein Sci 1999; 8: 180-195.

[42] Polgár T, Keserü GM. Virtual screening for -secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228. J Med Chem 2005; 48: 3749-3755.

[43] Huang D, Lüthi U, Kolb P, Cecchini M, Barberis A, Caflisch A. In silico discovery of β-secretase inhibitors. J Am Chem Soc 2006; 128: 5436-5443.

[44] Dominguez JL, Christopeit T, Villaverde MC, Gossas T, Otero JM, Nyström S, Baraznenok V, Lindström E, Danielson UH, Sussman F. Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1. Biochemistry 2010; 49: 7255-7263.

[45] Sussman F, Otero JM, Villaverde MC, Castro M, Domínguez JL, González-Louro L, Estévez RJ, Estévez JC. On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in -secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors. J Med Chem 2011; 54: 3081-3085.

[46] Domínguez JL, Gossas T, Villaverde MC, Danielson UH, Sussman F. Experimental and 'in silico' analysis of the effect of pH on HIV-1 protease inhibitor affinity: Implications for the charge state of the protein ionogenic groups. Bioorg Med Chem 2012; 20: 4838-4847.

[47] Smith R, Brereton IM, Chai RY, Kent SBH. Ionization states of the catalytic residues in HIV-1 protease. Nat Struct Biol 1996; 3: 946-950.

[48] Yamazaki T, Nicholson LK, Torchia DA, Wingfield P, Stahl SJ, Kaufman JD, Eyermann CJ, Hodge CN, Lam PYS, Ru Y, Jadhav PK, Chang CH, Weber PC. NMR and X-ray evidence that the HIV protease catalytic aspartyl groups are protonated in the complex formed by the protease and a non-peptide cyclic urea-based inhibitor. J Am Chem Soc 1994; 116: 10791-10792.

[49] Wang YX, Freedberg DI, Yamazaki T, Wingfield PT, Stahl SJ, Kaufman JD, Kiso Y, Torchia DA. Solution NMR evidence that the HIV-1 protease catalytic aspartyl groups have different ionization states in the complex formed with the asymmetric drug KNI-272. Biochemistry 1996; 35: 9945-9950.

[50] Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Liu B, Topol IA, Kiso Y, Mimoto T, Mitsuya H, Erickson JW. Structure of HIV-1 protease with KNI-272, a tight-binding transition-state analog containing allophenylnorstatine. Structure 1995; 3: 581-590.

[51] Wlodawer A, Erickson JW. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. Annu Rev Biochem 1993; 62: 543-585.

[52] Gómez J, Freire E. Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. J Mol Biol 1995; 252: 337-350.

[53] Xie D, Gulnik S, Collins L, Gustchina E, Suvorov L, Erickson JW. Dissection of the pH dependence of inhibitor binding energetics for an aspartic protease: direct measurement of the protonation states of the catalytic aspartic acid residues. Biochemistry 1997; 36: 16166-16172.

[54] Velazquez-Campoy A, Luque I, Todd MJ, Milutinovich M, Kiso Y, Freire, E. Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor. Protein Sci 2000; 9: 1801-1809.

[55] Adachi M, Ohhara T, Kurihara K, Tamada T, Honjo E, Okazaki N, Arai S, Shoyama Y, Kimura K, Matsumura H, Sugiyama S, Adachi H, Takano K, Mori Y, Hidaka K, Kimura T, Hayashi Y, Kiso Y, Kuroki R. Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 4641-4646.

[56] Gossas T, Danielson UH. Analysis of the pH-dependencies of the association and dissociation kinetics of HIV-1 protease inhibitors. J Mol Recognit 2003;16: 203-212.

[57] Markgren PO, Lindgren MT, Gertow K, Karlsson R, Hämäläinen M, Danielson UH. Determination of interaction kinetic constants for HIV-1 protease inhibitors using optical biosensor technology. Anal Biochem 2001; 291: 207-218.

[58] Karlsson M, Pavlov MY, Malmqvist M, Persson B, Ehrenberg M. Initiation of *Escherichia coli* ribosomes on matrix coupled mRNAs studied by optical biosensor technique. Biochemie 1999; 81: 995-1002.

[59] Im W, Lee MS, Brooks III CL. Generalized Born model with a simple smoothing function. J Comput Chem 2003; 24: 1691-1702.

[60] Spassov V Z, Yan L. A fast and accurate computational approach to protein ionization. Protein Sci 2008; 17: 1955-1970.

[61] Hong L, Koelsch G, Lin X, Wu S, Terzyan S, Ghosh AK, Zhang XC, Tang J. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β-secretase) complexed with inhibitor. Science 2000; 290: 150-153.

[62] Hong L, Turner III RT, Koelsch G, Shin D, Ghosh AK, Tang J.Crystal structure of mempasin 2 (-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. Biochemistry 2002; 41: 10963-10967.

[63] Stachel SJ, Coburn CA, Steele TG, Jones KG, Loutzenhiser EF, Gregro AR, Rajapakse HA, Lai MT, Crouthamel MC, Xu M, Tugusheva K, Lineberger JE, Pietrak BL, Espeseth AS, Shi XP, Chen-Dodson E, Holloway MK, Munshi S, Simon AJ, Kuo L, Vacca JP. Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human -secretase (BACE-1). J Med Chem 2004; 47: 6447-6450.

[64] Charrier N, Clarke B, Cutler L, Demont E, Dingwall C, Dunsdon R, East P, Hawkins J, Howes C, Hussain I, Jeffrey P, Maile G, Matico R, Mosley J, Naylor A, O'Brien A, Redshaw S, Rowland P, Soleil V, Smith KJ, Sweitzer S, Theobald P, Vesey D, Walter DS, Wayne G. Second generation of hidroxyethylamine BACE-1 inhibitors: optimizing potency and oral bioavailability. J Med Chem 2008; 51: 3313-3317.

[65] Rajapakse H A, Nantermet PG, Selnick HG, Munshi S, McGaughey GB, Lindsley SR, Young MB, Lai MT, Espeseth AS, Shi XP, Colussi D, Pietrak B, Crouthamel MC, Tugusheva K, Huang Q, Xu M, Simon AJ, Kuo L, Hazuda DJ, Graham S, Vacca, J. P. Discovery of oxadiazoyl tertiary carbinamine inhibitors of β-secretase (BACE-1). J Med Chem 2006; 49: 7270-7273.

[66] Piana S, Sebastiani D, Carloni P, Parrinello M. Ab-initio molecular dynamics-based assignment of the protonation state of pepstatin A/HIV-1 protease cleavage site. J Am Chem Soc 2001; 123: 8730-8737.

[67] Frey PA, Whitt SA, Tobin JB. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. Science 1994; 264: 1927-1930.

[68] Fitzgerald PMD, McKeever BM, VanMiddlesworth JF, Springer JP, Heimbach JC, Leu CT, Herber WK, Dixon RAF, Darke PL. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. J Biol Chem 1990; 265: 14209-14219.

[69] Momany FA, Klimkowski VJ, Schäfer L. On the use of conformationally dependent geometry trends from *ab initio* dipeptide studies to refine potentials for the empirical force field CHARMM. J Comput Chem1990; 11: 654-662.

[70] Stachel SJ, Coburn CA, Rush D, Jones KLG, Zhu H, Rajapakse H, Graham SL, Simon A, Holloway, MK, Allison T J, Munshi SK, Espeseth AS, Zuck P, Colussi D, Wolfe A, Pietrak BL, Lai MT, Vacca JP. Discovery of aminoheterocycles as a novel β-secretase inhibitor class: pH dependence on binding activity part 1. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 2977-2980.

[71] Polgár T, Magyar C, Simon I, Keserü GM. Impact of ligand protonation on virtual screening against β-secretase (BACE1). J Chem Inf Model 2007; 47: 2366-2373.

[72] Barman A, Prabhakar R. Protonation states of the catalytic dyad of β-Secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: a molecular docking study. J Chem Inf Model 2012; 52: 1275-1287.

[73] Kacker P, Masetti M, Mangold M, Bottegoni G, Cavalli A. Combining dyad protonation and active site plasticity in BACE-1 structure-based drug design. J Chem Inf Model 2012, 52: 1079-1085.

[74] Das A, Prashar V, Mahale S, Serre L, Ferre JL, Hosur MV. Crystal structure of HIV-1 protease *in situ* product complex and abservation of a low-barrier hydrogen bond between the catalytic aspartates. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 18464-18469.

Received: October 21, 2012 **Accepted: November 19, 2012**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Author's personal copy

J Comput Aided Mol Des (2013) 27:403–417
DOI 10.1007/s10822-013-9653-7

Effect of pH and ligand charge state on BACE-1 fragment docking performance

José L. Domínguez · M. Carmen Villaverde · Fredy Sussman

Received: 24 January 2013 / Accepted: 24 April 2013 / Published online: 3 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract In this work we propose a protocol for estimating the effect of pH on the docking performance to BACE-1, which affords the charge state of the inhibitor as well as the protonation state of all ionisable residues in the protein at a given pH value. To the best of our knowledge, this is the first report of a protocol predicting the BACE-1 ligand docking poses not only at the neutral pH at which most crystallographic structures were obtained, but also at the optimal pH of the enzyme (in the acidic range), at which most of the BACE-1 binding affinity assays are performed. We have applied this protocol to a set of 23 fragment-like BACE-1 ligands that span four orders of magnitude in their binding affinities. The pK_a values of the BACE-1 acidic residues deviate substantially from the estimates for model compounds in solution and display a ligand dependent variability, especially in the case of the catalytic Asp dyad residues. This outcome should have a strong bearing on the design of protocols for docking based BACE-1 screening campaigns. Finally, we were able to find an explanation for the poor docking success rate of some fragments based on the availability of anchoring points, a rationale that could help to improve hit rates in BACE-1 screening campaigns.

Keywords BACE-1 inhibition · Docking protocol · Protonation state · pH dependence · Docking performance · Fragment screening

Introduction

β-Site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE-1) is a prominent target in Alzheimer's disease (AD) drug discovery efforts. This enzyme (a member of the Asp protease family) cleaves the amyloid precursor protein (APP), generating hydrolytically a peptide of 42 residues in length called amyloid beta (Aβ) peptide, whose aggregation as oligomers in the inter-synapsis region is the cause of AD in accordance with the amyloid cascade hypothesis [1, 2]. Many problems have beset all the stages of the drug discovery efforts aimed at this enzyme, including failures in the early HTS campaigns for BACE-1 inhibitors [3, 4]. The use of fragment based search (FBS) methods has overcome some obstacles present in the search for hit leads for BACE. FBS seeks small molecules whose molecular weight is <300 Da, which will serve as kernels for high affinity binders after substantial modification [5–12]. Moreover, the search for low molecular weight drug leads is of special interest for CNS diseases, since it is a requirement for blood brain barrier trespassing [8, 10, 12].

One the main hurdles in the in silico FBS campaigns for BACE-1 is the prediction of the charge state of the binding site ionisable residues and the bound inhibitor, which in principle should have a strong influence on the outcome of the docking based screenings. Some of the earliest in silico HTS campaigns used a single Asp dyad protonation state in their screening campaigns, based on the hypothesis that most ligands induce a unique Asp dyad protonation state [13–15]. Our laboratory, based on a combination of surface

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10822-013-9653-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. L. Domínguez · M. C. Villaverde · F. Sussman (✉)
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: fredy.sussman@usc.es

Author's personal copy

plasmon resonance (SPR) experiments with molecular mechanics calculations was one of the first to provide some robust evidence that the charge state of the ionisable residues of BACE-1 strongly depends on the chemical nature of the inhibitor [16, 17] and hence any ligand screening protocol would require the prediction of the active site ionisable residues protonation state (when bound to a given inhibitor) ahead of the docking calculations. In the last few years there has been a keen interest on this issue, but its focus has been on the charged state of the Asp dyad, clearly disregarding the effect of the other acidic residues buried inside this enzyme [13–15].

Very recently Kacker et al. [18] used a very sophisticated combination of quantum mechanics calculations and molecular dynamics simulations to predict the protonation state of the enzyme's Asp dyad for subsequent self-docking, cross-docking and HTS studies, while Barman and Prabhakar [19] have searched through all possible charge positions to predict which Asp dyad charge combination generates the highest enrichment for self docking simulations, but to the best of our knowledge no pH dependence calculations have been carried out until now.

The X-ray crystallographic structures of BACE-1—inhibitor complexes are predominantly obtained at a pH close to neutral. Hence, the retrospective docking calculations should display an increased success rate for the inhibitor and ionisable protein residues charge state predicted to exist at this pH value. On the other hand, the majority of the BACE-1 inhibition assays are carried out at the acidic pH at which this enzyme has its optimal activity (4.5–5.0). The actual charge state of the Asp dyad and other active site residues at the enzyme's optimal pH for activity should certainly differ from the one at which the BACE-1—inhibitor crystallographic structures were obtained. To bridge this divide and to answer some of the other open questions stated above we have used a protocol that blends the pK_a prediction for BACE-1 titratable residues with the docking simulations. The results of these calculations have enabled us to perform docking calculations on a set of 23 ligands at both acidic and neutral pH values, and hence estimate the effect of the pH on the docking performance. The results indicate that these inhibitors are mostly charged at both pH values, since the charged inhibitors have a substantial increase in the hit success rate. A large number of the inhibitors studied here have a pK_a value of 7 or higher in solution. Hence this outcome implies that the enzyme environment will retain, or may be in a few cases raise, the solution pK_a value of the inhibitors.

The fact that the highest docking performance rate is obtained at a pH close to neutral supports the charge assignment prediction for the protein ionisable residues provided by our pK_a calculations. The Asp dyad protonation state has an evident effect on the docking hit enrichment. Moreover, including the predicted charge state of the acidic residues other than those belonging to the Asp dyad has a smaller but noticeable effect on the docking enrichment, since the calculated pK_a values for all acidic residues deviate from their estimates for model compounds and present a clear ligand dependence. Hence, protocols used in the BACE-1 screening campaigns should include the pK_a value prediction for all these residues.

Finally, we were able to elaborate an explanation for the low success rate of some ligands, based on the availability of anchoring points, an idea that could be exploited in weeding out false negatives or false positives in BACE-1 screening campaigns.

Methods

The group of 23 BACE-1 inhibitor fragments studied are displayed in Fig. 1. The structures of 20 out of 23 ligands bound to BACE-1 are known, and their PDB entry names are included in the figure as ligand identifiers. Perusal of these compounds indicates that the molecular weight of most of them is <350 Da (a value slightly above than the fragment cutoff of 300 Da), making them good candidates for fragment like inhibitors, which can be enlarged to attain good affinities. The last three entries in this list (compounds 3H0B0, 3H0BM and 3H0BS) represent small modifications of the ligand in PDB entry 3H0B [12]. These variants were studied because, to the best of our knowledge, they are the only ones that have published binding affinities at two pH values (4.5 and 6.5) [12], and hence they are valuable for testing our approach. The affinities of all compounds for BACE-1 and the ligand efficiencies are shown in Table 1. As seen from this table, the binding affinities have very diverse values, spanning four orders of magnitude from millimolar to sub-micromolar range.

The BACE-1 complexes were downloaded from the protein data bank (PDB) and hydrogens were added using the Discovery Studio (DS) suite of programs [20]. Most structures have a resolution below 2.5 Å, although all the complexes present one or more residue gaps in their structure. The most frequent structural breakpoint starts around residue 157 and extends for 9–12 residues. Other gaps start at residues 310 and extend for around 6 or 7 residues. We have generated gap-less complexes using a protocol previously described, which copies the missing fragments from the complex found in pdb entry 1FKN and then optimize the structure around the insertion location by an energy minimization protocol [16].

In order to assign the protonation states of the ionisable residues in BACE-1, the pK_a values of these residues were calculated by CPIRpK [21], a protocol resident in the

Author's personal copy

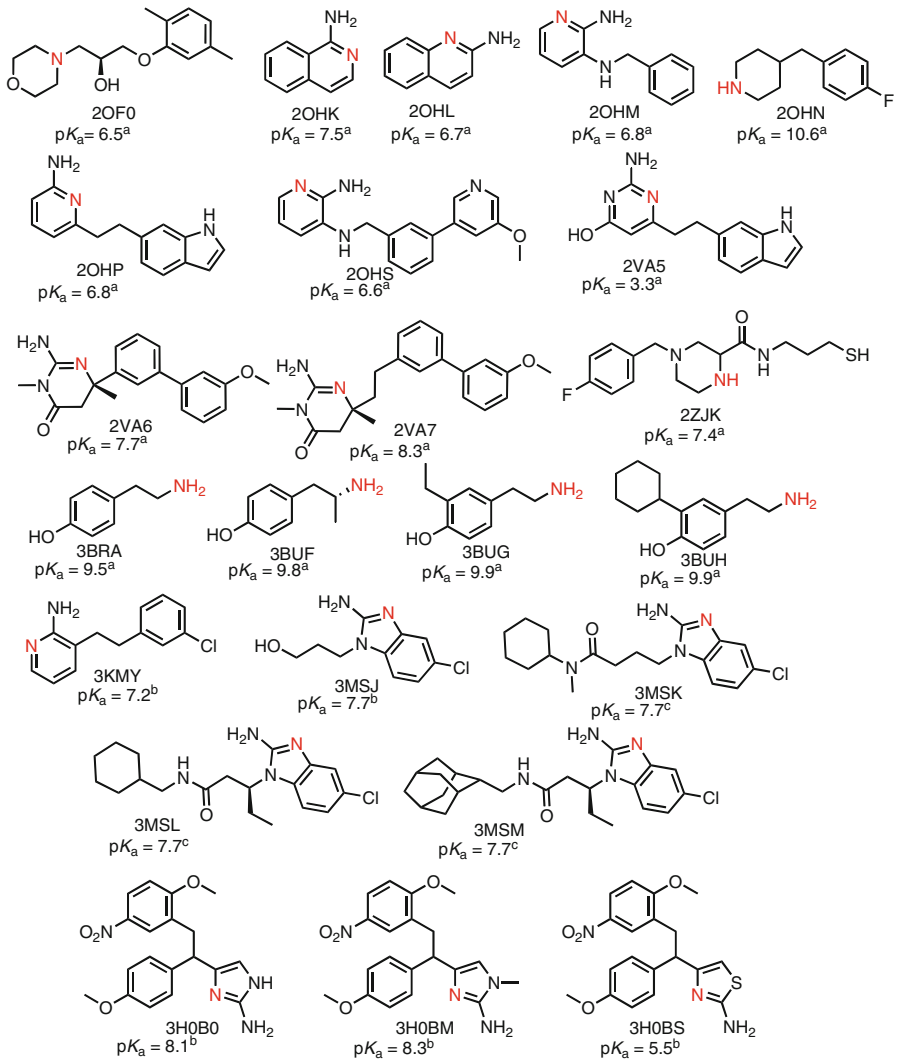


Fig. 1 Chemical structure of the inhibitor fragments used in our study named by the PDB id entries of their complexes with BACE-1. The N atom shown in *red* is the one that is most likely protonated.[a]Scifinder result [23]. [b]Literature value (see references [11] and [12]). [c]Estimation by analogy

Discovery Studio set of programs that evaluates the solvation effects by an approximate Generalized Born algorithm [22]. CPIRpK is able to afford highly accurate pK_a values with little computational cost. In the original work, this approach was tested on the pK_a prediction of all titratable residues in 24 proteins. The results indicate that the RMSD between the calculated and observed pK_a values lies for the most part below 0.5 pK_a units [21]. In our calculations we chose the charge assignments at two pH values (4.5 and 7.4). Since most of the X-ray structure studies that provided the observed ligand pose were obtained at pH values close to neutral, we proceeded to assign charge states of the ionisable residues of BACE-1 at pH 7.4 according to their pK_a values. On the other hand we thought interesting to perform docking at the acidic pH close to the one where this enzyme has its optimal activity (4.5), since most of the inhibitor binding assays are performed around this value. In the case of 3H0B ligand analogues discussed in reference 12, the authors have studied the effect of pH on inhibitor binding at pH 4.5 and 6.5. In order to test our protocol we have calculated the binding affinities for ligand 3H0BS at pH 6.5 as well.

A crucial issue in the prediction of the BACE-1 active site charge state is the inhibitor protonation state. As seen from Fig. 1 most inhibitors have one or several amino groups that could interact with the Asp dyad through electrostatic interactions. To determine the proclivity of the amino groups to be protonated we have searched either the

Author's personal copy

Table 1 BACE-1 ligand inhibition data and efficiency (L. E.) for in vitro assays

Ligand ID	IC_{50} (μM)	K_D (μM)	L. E.	References
2OF0	>2,000		<0.19	[5]
2OHK	~2,000		0.33	[5]
2OHL	~2,000		0.33	[5]
2OHM	310		0.32	[5]
2OHN	~500		0.32	[5]
2OHP	94		0.31	[6]
2OHS	40		0.26	[6]
2VA5	130		0.28	[7]
2VA6	0.38		0.36	[7]
2VA7	0.20		0.35	[7]
2ZJK		>1,000		[8]
3BRA		2,000	0.37	[9]
3BUF		800	0.38	[9]
3BUG		660	0.36	[9]
3BUH		220	0.31	[9]
3KMY		32	0.38	[10]
3MSJ	770		0.29	[11]
3MSK	26		0.27	[11]
3MSL	7		0.29	[11]
3MSM	8.9		0.26	[11]
3H0B0	5.7		0.27	[12]
3H0BM	0.47		0.31	[12]
3H0BS	1.1		0.30	[12]

original references or we performed SciFinder searches based on the ACD labs predictor [23]. In Fig. 1 the nitrogen atoms of the amino groups whose protonated form is predicted to have the highest pK_a value, are singled out in red. The BACE-1 structures with their titratable residues charge states assigned, both at pH 4.5 and 7.4, served as a template for docking calculations performed with GOLD [24]. The GOLD runs were configured to return 25 poses, with a number of iterations in the genetic algorithm ranging from a minimum of 1,000,000 to a maximum of 1,250,000. To ensure a wider range of poses, we used the 'Diverse Solutions' option in GOLD, which avoids the existence of clusters with similar solutions. The GoldScore [25, 26], ChemScore [27–29] and ChemPLP [30] scoring functions were used to generate the binding conformations. Each of the resulting poses was then rescored with each of the aforementioned scoring functions.

Earlier work has acknowledged that the use of molecular mechanics (MM) force fields enhanced the number of poses closer to the observed ones, and specifically in screening campaigns reduces the number of false positives and false negatives [31, 32]. Following this idea we have rescored our set of poses obtained from GOLD-based docking simulations for every compound by two molecular mechanics CHARMM rescoring functions based on the protein–ligand interaction energy. In the first MM rescoring function (referred to as Charmm) the poses for each ligand were subjected to a proton only energy minimization run, performed in two steps: 2,000 steps Steepest Descent minimization protocol, which was followed by a 50,000 step ABNR minimization, both with a 0.002 gradient tolerance. The second re-scoring function (referred to as h.Charmm) involved a MM protocol in which the atoms were restrained to move under a harmonic potential with a force constant value of twice the value of the atomic mass of each atom. The minimization schedule was the same as in the first MM protocol. The structures were ranked by the MM binding energy in the rigid body approximation that includes an implicit generalized Born model with a simple smoothing function (GBSW) desolvation term [22]. The force field chosen in all our MM calculations was CHARMM, due to the large availability of parameters for non-peptidic fragments in this force field [33], and the suite of programs used to run these calculations was CHARMM version 34b2 [34].

Docking performance assessment

The metrics for the native docking calculations carried out here starts with the evaluation of the RMSD between one or more of the top-ranked pose solutions and the X-ray binding mode. Docking performance was defined as the percentage of complexes in a set for which the RMSD between the three top-ranked solutions and the X-ray binding mode is below a certain cut-off. In the literature, an RMSD cutoff of 2.0 Å is used widely to assess docking performance. Nevertheless, in the case of fragments it was found recently that a lower cut-off (1.5 Å) is more appropriate, since the poses that fall in the range of RMSD values spanning from 1.5 to 2.0 Å may contain meaningful mistakes and the overall orientation of the ligand may be substantially different from those found in the observed structures [35].

In our calculations the success rate for a given simulation will depend on many parameters, which include the docking scoring function, the environmental pH, the inhibitor charged state, and the re-scoring function. For any of the possible combination of factors we have defined the success rate for compound i [SR(i)] by the following expression:

$$SR(i) = N_C(i)/N_T \quad (1)$$

where $N_C(i)$ is the number of poses found to have a RMSD <1.5 Å amongst top N_T ranking positions.

The total success rate, given by the hit percentage rate (hit %), for all ligands studied here at a given pH value by each of the rescoring functions can be calculated by the following expression:

Author's personal copy

$$\text{hit}\,\% = \sum_i \text{SR(i)}/\text{N}_\text{L} \quad (2)$$

where N_L is total number of ligands.

An optional statistic used by other groups is to calculate the success rate by finding for every compound one pose amongst the top N_T ranking positions (within a RMSD value) and then apply Eq. 2. Increasing the number of poses that may be screened for hits improves substantially the enrichment rate. Recently, Kacker et al. [18] obtained at 90 % hit rate when using the top ten ranking docking exits as possible hits.

Results

Protonation state of the inhibitor amino groups and BACE-1 acidic residues

Perusal of the X-ray structures of the BACE-1 bound fragments listed in Fig. 1 indicate that these compounds anchor themselves to the Asp dyad through their amino groups by hydrogen bonds or by direct ion pair interactions. As it can be seen from Fig. 1, many compounds contain more than one amino group. Hence, identifying the amino group that is most likely to be protonated is essential for predicting the binding pose.

As seen from Fig. 1, many of the fragments have the protonated amino groups with a pK_a value in solution close or above 7.0. Taking the solution pK_a values as a guide, 15 of the compounds studied will be charged both at pH 4.5 and 7.4, while 8 will be charged only at an acidic pH (e.g., 3H0BS). Nevertheless, the actual pK_a value of the fragment, when bound to BACE-1, may vary due to their proximity to charged residues like those of the Asp dyad. For instance, our literature survey of 2-amino pyrimidine fragment found in inhibitor 2VA5, indicates that the nitrogen group at position 3 (closest to the hydroxyl group) is the one with largest pK_a value. However, the nitrogen that makes a hydrogen bond contact with one of the Asp dyad oxygen carboxylates is at position 1 in the pyrimdine ring, and hence it should be the amino group that is most likely protonated (see Fig. 1). As we shall see below this protonation state is the one that provides a better docking performance.

Once we had a preliminary identification of the protonated amine group in these fragments, we calculated the pK_a values of all titratable residues in BACE-1 either for a neutral or a charged inhibitor. Table 2 displays the pK_a values only for the Asp dyad residues in BACE-1 (Asp 32/Asp 228) when the fragments are either neutral or protonated. As seen from this table, the charged states of the inhibitor have a marked effect upon the Asp dyad pK_a values. For instance, assigning a charge to the inhibitor lowers substantially the pK_a values of the Asp dyad residues. The resulting pK_a values have allowed us to predict the protonation state of these residues at both pH values (4.5 and 7.4) needed for our studies. Previous studies performed in our laboratory on the effect of the pH on the binding affinity of some peptidomimetic BACE-1 inhibitors predicted that Asp 32 always had a higher proclivity to stay protonated than did Asp 228, over a larger pH value span [16]. The results shown in this Table indicate that for a large number of ligands, the aforementioned pK_a order still holds. Nevertheless, in some cases, especially when the ligand is protonated, the pK_a ranking amongst the Asp dyad residues is inverted. For instance, that is the case of BACE-1 bound to charged inhibitors 2OHL, 3BRA and 3BUG. Hence, the Asp dyad adopts a wide variety of protonation states depending on the charge state of the inhibitor and the environmental pH value. When a charge of +1 is assigned to the inhibitors at the enzyme's optimal pH (4.5), most of complexes are predicted to have a monoprotonated Asp dyad, although a certain number of alternative states (i.e., diprotonated and doubly charged) are possible. If the pH is raised to a value close to neutral (7.4), we predict that the inhibitor binding elicits mostly a doubly charged Asp dyad state.

The presence of the ligands not only affects the pK_a values of the Asp dyad but has a strong influence on the protonation state of some of the other acidic residues (see Online Resource 1). Many of these residues have pK_a values that show strong upwards and downwards shifts from the estimates for model Asp and Glu residues in solution. There also seems to be a pK_a variability for a given BACE-1 residue when bound to different inhibitors. In some cases these pK_a differences could reach more than one pK_a unit.

Effect of the protonation state of the inhibitor and the charge of the protein residues on the docking performance

To gauge the effect of the inhibitor charge state and the protein residues protonation states at two pH values onto the docking performance, we have calculated the RMSD from the poses resulting from the self docking simulations with respect to the observed crystallographic poses. The results are shown in Fig. 2, which displays the effect of the pH through a histogram distribution at increasing RMSD value, for both neutral and charged ligands. The RMSD distribution was calculated from Eqs. 1 and 2 with the N_T value set to 25 (the number of pose exits). As seen from this figure, there is a marked effect of the inhibitor's protonation state in their self-docking success. The charged inhibitors increase substantially the percentage of hits at the lowest RMSD bin (<1.5 Å) and decrease the number of poses with hits with the highest RMSD values (i.e. >6.0 Å).

Author's personal copy

Table 2 Predicted Asp dyad pK_a values

Ligand ID	Residue	pK_a value	
		Neutral ligand	Charged ligand
2OF0	Asp 32	8.6	6.4
	Asp 228	6.4	4.2
2OHK	Asp 32	8.8	4.0
	Asp 228	5.1	4.3
2OHL	Asp 32	8.3	3.5
	Asp 228	5.7	6.0
2OHM	Asp 32	6.6	5.2
	Asp 228	8.1	4.4
2OHN	Asp 32	6.4	5.9
	Asp 228	4.5	2.9
2OHP	Asp 32	9.5	5.7
	Asp 228	5.9	5.3
2OHS	Asp 32	7.3	7.2
	Asp 228	7.8	4.3
2VA5	Asp 32	8.7	5.7
	Asp 228	5.3	4.1
2VA6	Asp 32	8.4	5.9
	Asp 228	5.8	3.8
2VA7	Asp 32	8.8	6.1
	Asp 228	5.8	3.9
2ZJK	Asp 32	6.2	6.1
	Asp 228	4.8	4.6
3BRA	Asp 32	6.5	4.2
	Asp 228	4.7	5.2
3BUF	Asp 32	7.0	4.5
	Asp 228	4.7	5.4
3BUG	Asp 32	6.5	4.4
	Asp 228	5.1	5.7
3BUH	Asp 32	7.0	4.5
	Asp 228	5.0	5.7
3H0B0	Asp 32	6.8	5.2
	Asp 228	7.0	5.6
3H0BM	Asp 32	7.6	5.0
	Asp 228	6.9	5.7
3H0BS	Asp 32	7.6	4.3
	Asp 228	6.7	5.3
3KMY	Asp 32	7.2	7.2
	Asp 228	8.4	3.7
3MSJ	Asp 32	9.0	6.2
	Asp 228	6.7	5.0
3MSK	Asp 32	8.4	5.3
	Asp 228	6.0	4.3
3MSL	Asp 32	8.1	5.6
	Asp 228	6.0	3.9
3MSM	Asp 32	8.6	5.6
	Asp 228	6.0	3.9

To study the effect of the scoring function on hit enrichment we have proceeded to rescore the original GOLD hits not only with some of the GOLD resident fitness functions (GoldScore, ChemScore and ChemPLP), but with Charmm scoring functions as well (see "Methods" section). One of the main differences between both types of scoring functions resides in the representation of hydrogen bonds and direct ion pair interactions. While the MM based scoring functions represent these non-bonded interactions by a Coulombic interaction screened by an implicit generalized Born desolvation term, the fitness scoring functions (resident in GOLD) represent them by typical short range hydrogen bond functions. Hence, when the GOLD resident scoring functions are used, the ionisable protein residues that are not at a hydrogen bond distances with the functional groups of the inhibitor do not participate in ranking the ligand's pose when the distances between donors and acceptors are beyond a certain cutoff.

One of the major problems when comparing the results of docking predictions of different labs is that each group uses diverse metrics for pose acceptance. Perusal of the literature indicate that one of the most glaring differences in the docking studies (even to the same protein) is the number of top ranking poses allowed in the search for a low RMSD candidate. Recent studies related to the effect of the protonation state of the Asp dyad in docking calculations to BACE-1 [18, 19] have allowed a set of ten top ranking poses for a RMSD hit, while other authors use less permissive metrics that includes search hits only at the top ranking pose in three parallel docking runs [35]. To determine the effect of the ranking set size on our results, we have calculated the effect of the inhibitor protonation state and pH for increasing the pose set size. The results are displayed in Figs. 3, 4 and 5. While Fig. 3 displays the percentage of hits at RMSD <1.5 Å that are found amongst the top three poses, Fig. 4 depicts the success rate resulting of finding at least one hit at this RMSD cutoff amongst the top three poses. Finally, Fig. 5 displays the single hit success amongst the top ten poses. The results of Figs. 3, 4 and 5 include the hit rate for the various re-scoring functions for both protonated and neutral ligand at two pH values used in our studies. For reference we have performed as well docking simulations with the protein having all ionogenic residues charged, regardless of their degree of burial (referred to as no CPI in Figs. 3, 4, 5).

One of the most outstanding results observed in Fig. 3 relates to the marked effect of the inhibitor protonation state. As seen from this figure, charged ligands exhibit a marked success rate enhancement over neutral ligands, for all re-scoring functions and pH values used. One of the highest hit percentage increases is observed for those that resulted from the docking carried out with the Charmm and

Author's personal copy

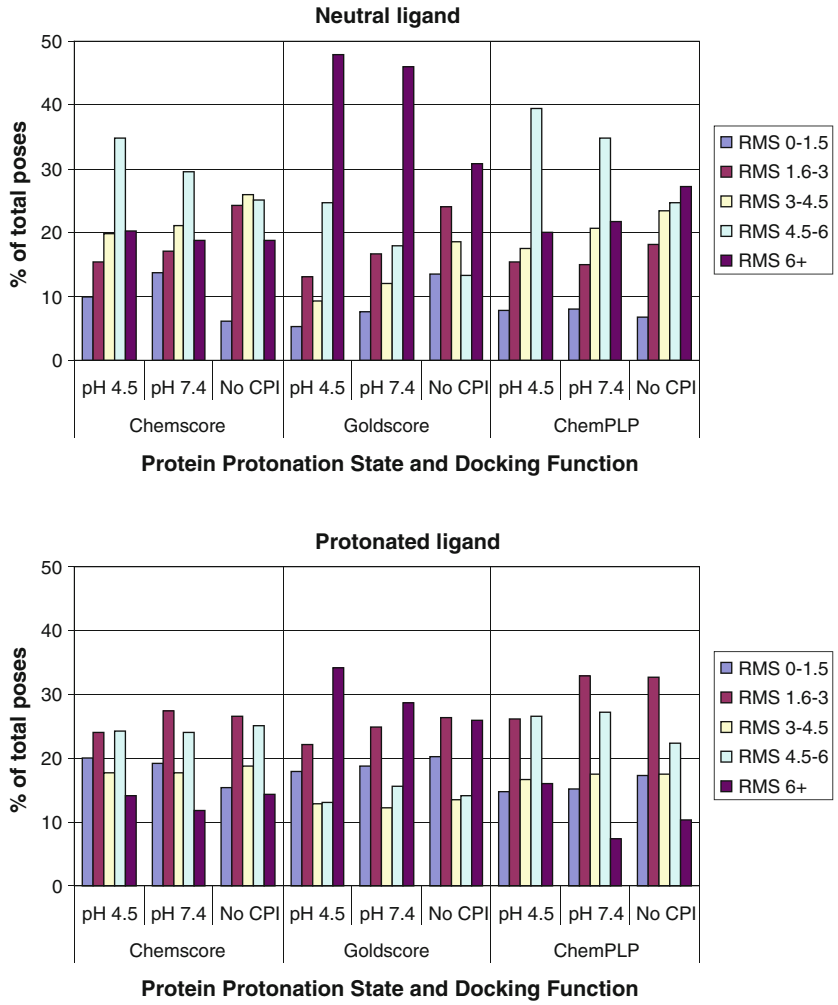


Fig. 2 Percentage of poses found at a given RMS value (see *colour code*), resulting from the docking calculation with a given scoring function (Chemscore, Goldscore and ChemPLP) performed at the indicated pH value.Calculations referred to as No CPI were performed with all protein ionisable residues charged

h.Charmm re-scoring of the ChemPLP poses at pH 7.4 and for the no CPI charge state. As seen from Fig. 3, the percentage of hits doubles from ∼30 to 60 % when the ligand adquires a charge. For protonated ligands, the highest success rates are provided by MM based rescoring functions. For instance, rescoring by the harmonic Charmm (h.Charmm) protocol, leads to a 75 % success rate for docking calculations performed with Chemscore at pH 7.4.

The correct prediction of the ionization states of the acidic residues should help to increase the number of poses at lower RMSD values. Since the original crystallographic structures were obtained at pH close to neutral, it is expected that the assignment of the charge state of the protein residues at this pH value should produce the largest hit enrichment. Results shown at the lower panel of Fig. 3 support (as expected) the higher success rate at pH 7.4, especially for docking calculations performed with ChemScore. In this case the additional enrichment could be as much as 20 % when the rescoring is performed with h.Charmm over those calculated at pH 4.5 and ca. 14 % over the fully charged protein (i.e., no CPI). Hit rates obtained when the docking of protonated fragments is performed by either GoldScore or ChemPLP scoring functions still indicate that the highest enrichment rates are obtained at pH 7.4 but the differences are smaller, especially when compared to the no CPI results. These reduced differences with respect to the no CPI calculations can be partially explained by the pK_a values of the active site residues. As seen from Table 2, in the case that the ligand is protonated at neutral pH, the Asp dyad (in many cases)

Author's personal copy

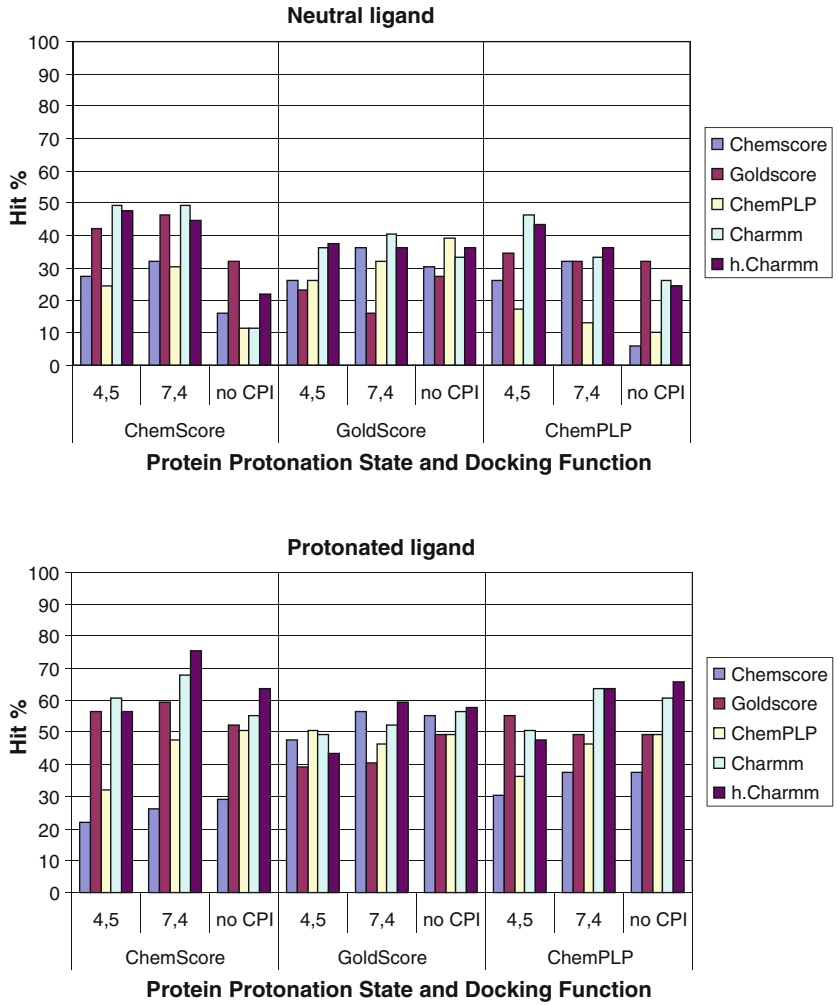


Fig. 3 The success rate (percentage of compounds with RMSD < 1.5 Å) amongst the top three ranking poses after rescoring with the functions shown at the right of every panel.Results for neutral ligands are shown in the *upper panel* and results for protonated ligands are shown in the *lower panel*

has a charge of -2, the same value that it would have when there is no charged assignment for this pair of residues. Still, for some docking protocols there is a noticeable difference between the docking success rate at pH 7.4 and the one where no charge assignment has been made. As mentioned above, that is the case of the Charmm and h.Charmm rescoring of docking pose generation with ChemScore (see Fig. 3). As observed from Fig. 3, another factor that has a strong effect on the success rate is the quality of the scoring functions. As pointed out before, many GOLD's off-the-shelf scoring functions, reduce the range of the electrostatic interactions that are crucial for fully translating the effect of the acidic residues charge state into pose location, since they replace the Coulombic interactions present in MM approaches by hydrogen bond type functions. The results shown in Fig. 3 indicate that the MM fare in many cases better than the original fitness functions and hence their use in the original pose generation may improve even more the hit enrichment, indicating that the Coulombic type of representation for electrostatic interactions are important for translating the effect of the charge state of the ionisable residues into finding a correct binding pose.

Allowing a search for the pose hit amongst a larger number of ranking poses improves the hit rate to levels (as seen from the comparison of Figs. 3 and 5) observed in other studies with similar pose number cutoff values [18]. Nevertheless, an increase in the number of acceptable poses seems to reduce the performance differences between the docking calculations carried out at dissimilar

Author's personal copy

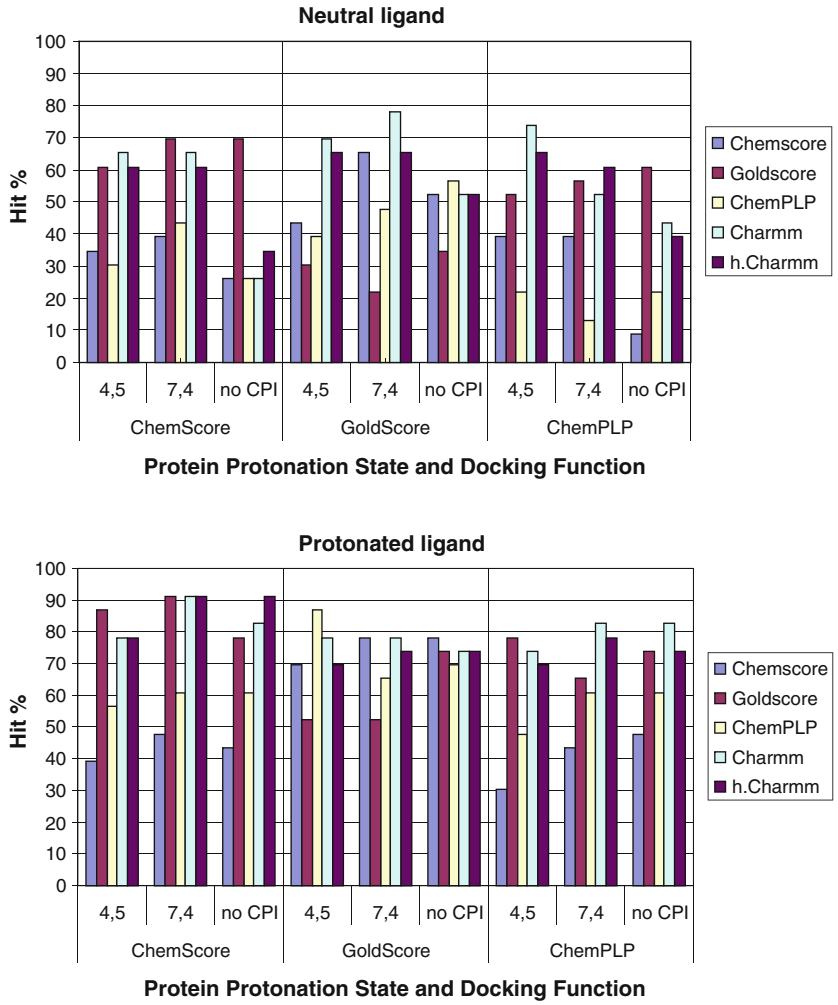


Fig. 4 Percentage of fragments that have at least one pose hit (within less that 1.5 Å from the crystal structure) amongst the three top poses as ranked by rescoring value.Results for neutral ligands are shown in the *upper panel* and results for protonated ligands are shown in the *lower panel*

pH values or rescored with different functions (see Fig. 5), a result that lends support for docking simulations carried out with more stringent searches.

Rationale for pH dependence

Very rarely the pH dependence on ligand binding to a protein is studied. For the set of ligands studied here the only case where this effect has been analyzed is in the case of 3H0B derivatives. In that work, the binding of amino-heterocyclic based compounds was studied at both pH 4.5 and 6.5. For the derivative containing a thiazole moiety (3H0BS), the experimental results indicate that the binding affinity observed at pH 4.5 ($IC_{50} = 1.1$ μM) is reduced drastically upon a pH increase (0 % inhibition at pH 6.5) [12]. To test our protocol we have re-scored the 25 top GOLD exit docking poses with our Charmm and h.Charmm scoring function values for this ligand at both pH values, when the inhibitor is charged and neutral. Figure 6 displays the binding ranking prediction at both pH values for the top ranked re-scored pose. As seen from this figure, the molecular mechanics based scoring results indicate that the drop in affinity observed experimentally can only be clearly seen in our calculations when we assume that at the higher pH value the ligand becomes neutral (see Fig. 6). This outcome supports the possibility that the pK_a in solution (5.5) is kept when the ligand is bound to BACE-1, and indicates that our protocol should be useful in predicting approximate figures for the pK_a value of the inhibitor when bound to the active site of BACE-1.

Author's personal copy

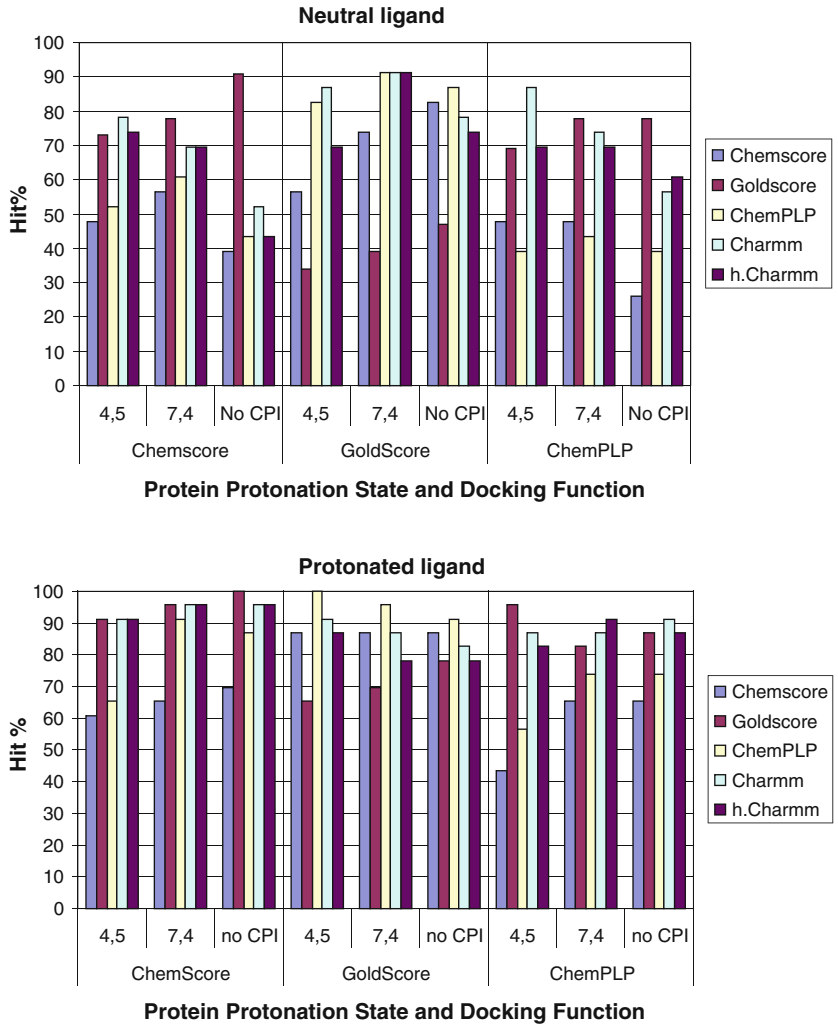


Fig. 5 Percentage of fragments that have at least one pose hit (within less that 1.5 Å from the crystal structure) amongst the ten top poses as ranked by rescoring value.Results for neutral ligands are shown in the *upper panel* and results for protonated ligands are shown in the *lower panel*

Rationale behind self-docking success

The high throughput search for non-peptidic ligands for BACE has been beset by many setbacks, due to the special features of the enzyme's binding site, which relate in part to its plasticity and its high exposure to solvent. Table 3 lists the overall docking performance for neutral and protonated ligands at both pH values. As seen from this table many compounds have good success rates across the board, regardless of the protonation state of the ligand and/or the environmental pH. (e.g., compounds 2OHN, 2VA7, 2VA6). We have found that the success rate is clearly linked to a proper assignment of the protonated amino group in the inhibitor. For instance, the final assignment in ligand 2VA5 (protonated at position 1) improves the overall hit rate by ~30 % over the one that places the charge at position 3 (results not shown).

A small set of compounds seem to have overall poor self-docking success rates. That is the case for compounds 2ZJK, 3BRA, 3BUG, 3BUF, whose success rates are sometimes well below 30 %. Finding an explanation for the low success rate of these compounds on the basis of their chemical structure and/or the type of interactions they generate with the enzyme could be very valuable in informing future BACE-1 targeted screening campaigns. Below we shall discuss this issue in some detail.

Discussion and conclusions

Many authors have investigated the effect of the charge state of the inhibitor and acidic residues on the docking success rate for BACE-1 [14, 15, 18, 19] and other proteins

Author's personal copy

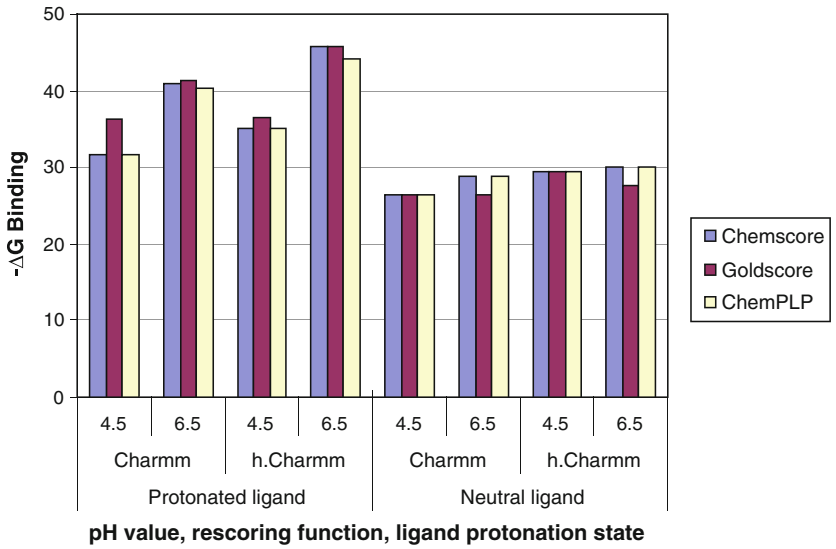


Fig. 6 Rescoring results (referred to as ΔG binding) for the top ranked 3H0BS pose, docked originally by the resident GOLD scoring functions (GoldScore, ChemScore and ChemPLP).The revaluation was performed for both neutral and protonated ligands at both pH 4.5 and 6.5, using the Charmm and h.Charmm scoring functions. ΔG rescoring values are in kcal/mol

Table 3 Percentage hit rates at RMSD <1.5 Å across all protocols

Ligand	Neutral	Protonated	Average
2OF0	17.8	55.6	36.7
2OHK	4.4	80	42.2
2OHL	6.7	93.3	50.0
2OHM	60	91.1	75.6
2OHN	80	97.8	88.9
2OHP	51.1	82.2	66.7
2OHS	64.4	91.1	77.8
2VA5	28.9	64.4	47.0
2VA6	84.4	82.2	83.3
2VA7	95.6	95.6	95.6
2ZJK	17.8	24.4	21.1
3BRA	17.8	37.8	27.8
3BUF	24.4	13.3	18.9
3BUG	15.6	11.1	13.3
3BUH	66.7	51.1	58.9
3KMY	66.7	91.1	78.9
3MSJ	22.2	73.3	47.8
3MSK	28.9	51.1	40.0
3MSL	55.6	91.1	73.3
3MSM	77.8	97.8	87.8
3HOB0	73.3	73.3	73.3
3HOBM	66.7	68.9	67.8
3HOBS	64.4	77.8	71.1

[36]. Nevertheless, in BACE-1 the effect of acidic residues other than the ones belonging to the Asp dyad has been disregarded. One of the first studies by Polgar et al. [15] investigated the effect of the inhibitor protonation state on the screening of BACE-1 ligands. The screening was performed by docking the putative ligands into a BACE-1 template with a charge assignment of −1 for the Asp dyad, regardless of the chemical nature of the inhibitor. As pointed in the introduction we have shown recently that the charge assignment for the Asp dyad strongly depends on the chemical structure of the ligand [16]. A corollary for this result is that BACE-1 screening campaigns should require the prediction of the charge state of BACE-1 acidic residues ahead of the docking stage. This idea has been recently incorporated in part to self-docking, cross-docking and screening studies to BACE-1 [18, 19], however to the best of our knowledge, the present study is the first time that the effect of pH on docking performance has been studied and the protonation state of *all* titratable residues in BACE-1 has been predicted ahead of the docking simulations by using a very fast predictive algorithm [21]. Our results indicate that although there are very few acidic residues (other than those belonging to the Asp dyad) that establish direct contacts with the inhibitor, many residues that are negatively charged in solution undergo upward or downward shifts in their pK_a values with respect to those used for model compounds of Asp and Glu residues in solution [16]. This outcome may be the result of the microenvironment in which these residues find themselves. Those residues that undergo downward shift would find themselves in a polar microenvironment, while those that experience an upward shift could find themselves buried in a hydrophobic pocket. Moreover, the pK_a value of an acidic

Author's personal copy

residue (other than those of the Asp dyad) may differ sometimes by more than one pK_a unit when one ligand is replaced by other in a BACE-1-inhibitor complex (see Online Resource 1). Hence, given the long-range nature of the electrostatic interactions, the charge state of these acidic residues may influence the actual binding pose of different ligands in very diverse ways. In order to take into account these long-range interactions, new scoring functions that include electrostatic interactions like the MM based one discussed above should be used, even for pose generation. As mentioned in the results section, our calculations show in some cases an increment in the success rate when the whole enzyme is charge typed according to the pK_a predictions, especially when the MM re-scoring functions are used (see Fig. 3), indicating that the long range electrostatic interactions may play a role in finding the correct binding pose as well.

Underlying rationale for docking performance

Many authors have elaborated proposals that could explain the failures at the pose search and re-scoring stages in docking simulations. Docking performance has been related to the ligand affinity for the enzyme, since high-affinity inhibitors may be 'easier' to dock than weaker binding compounds. Other authors suggested an alternative hypothesis that related improved docking performance with enhanced observed ligand binding efficiency (LE) [35]. These authors set a cutoff value for LE of 0.4, below which the probability for poor docking performance increases. Examination of Tables 1 and 3 clearly indicates that although the compounds with the lowest docking performance are amongst the ones that have lowest binding affinities, there is not a direct correlation between docking performance and binding strength. The experimental values for LE lie in the range between 0.19 and 0.38 (see Table 1), below the cutoff value of 0.4 proposed earlier for good docking performance [35]. Actually, some of the compounds with a LE close to 0.4 (3BRA, 3BUF and 3BUG) have resulted amongst the worst 'dockers' in our calculations.

We have found retrospectively a possible structural rationale for the poor performance of the worst 'dockers' based on the crystallographic ligand poses. In some instances (e.g., 3BRA, 3BUG and 3BUF) the primary amine group makes hydrogen bonds with only one of the residues belonging to the Asp dyad (Asp 32). The other hydrogen bond is found between the hydroxyl group of the phenol moiety and Phe 108. Figure 7 displays the overlap of one of highest scoring function poses obtained with the h.Charmm rescoring function and the X-ray crystal structure for the 3BUG ligand. As seen from this figure, the lack of an additional hydrogen bond interaction with Asp 228 seems to allow for the rotation of the aliphatic chain and the phenol moiety. Although the RMSD value for the pose displayed here is $\sim$3.3 Å, the hydrogen bond anchoring pattern is well reproduced. The lack of hydrogen bond anchoring motifs is most evident for ligand 2ZJK, which does not generate any sort of interactions with the Asp dyad and makes only one hydrogen bond with Tyr 71, leaving the ligand very unconstrained. This fragment was not generated

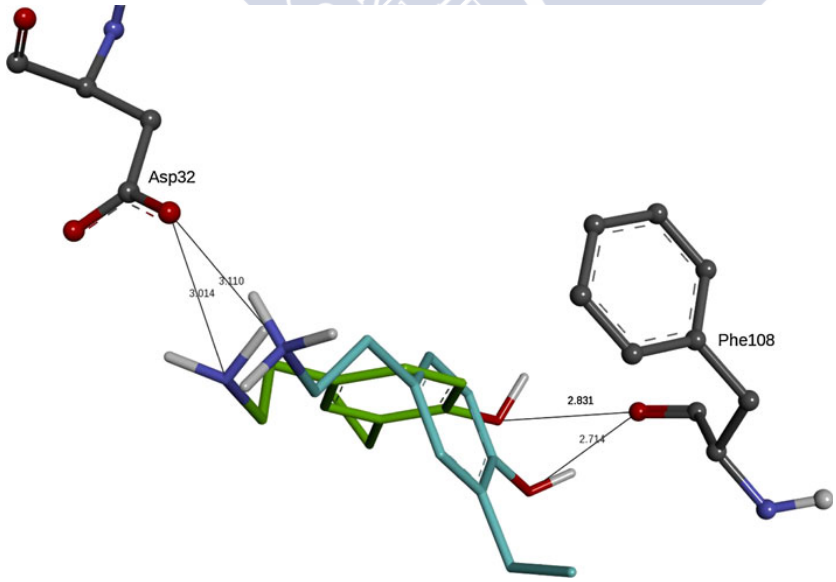


Fig. 7 Overlap of the 3BUG highest-ranking pose (*light blue*) with the crystallographic (*green*) structure.*Notice* that the HB's with anchoring residues are kept for both poses

Author's personal copy

by HTS in silico or in vitro, but was one of the kernels of a di-sulfide bond based tethering technology, used to obtain larger inhibitors. This method entails the introduction of individual Cys mutations in a binding site of interest, followed by screening against libraries of thiol-linker containing fragments that could produce disulfide bonds with the Cys residues introduced in the target protein [8]. The resulting crystallographic pose contains an enzyme-ligand di-sulfide bond, which should be important in generating the observed ligand conformation. Performing (as we did) docking simulations in the absence of this bond seems to reduce substantially the docking performance of this ligand.

It has been found that including into the docking simulations the crystallographic active site water molecules that make hydrogen bond interactions with the ligand could help improve the docking pose close to the observed crystallographic pose [37]. Perusal of the crystal structure the BACE-1—inhibitor complexes, indicate that some of them (e.g., 3BRA, 3BUF, 3BUG and 3BUH) have indeed one or sometimes two water molecules in the active site. Since these crystallographic waters make hydrogen bond interactions with the only amine group of the inhibitor (which already has been anchored by one of the Asp dyad members), we do not expect that including them into the docking simulations will help restrict the conformational space of the ligand enough to come close to the crystallographic pose. We tested this hypothesis by performing again docking calculations for one case (3BRA), in which the two water molecules present in the active site of the crystallographic structure were included. The results indicate that in this new round of calculations the number of RMSD hits remains almost unchanged (results not shown), an outcome that validated our informed supposition.

Our results predict that the best way of assuring a pose close to the observed one relies on having a number of hydrogen bond or other electrostatic interactions with the Asp dyad and polar functional groups of other residues. Nevertheless, other alternatives that favour a 'correct' pose are possible. For instance, 3BUH has a better performance than ligands 3BRA, 3BUG and 3BUF. It would seem that the cyclohexane moiety absent in the above mentioned compounds, but present in 3BUH (see Fig. 1) reduces the conformational flexibility by generating steric clashes that orient the molecule into a pose close to the observed one.

Our results indicate that the best docking enrichment is obtained at pH 7.4, in line with the fact that the original structures were obtained at a neutral pH. Nevertheless, all the binding affinities listed in Table 1 (obtained by FRET or SPR methods) were obtained at the optimal pH value which lies in the acidic range. We have investigated whether our docking protocol is able to predict at least in part the binding ranking of our ligands. The results indicate that our algorithm is only able to place the inhibitors with the highest binding affinities at the top of the ranking list and the worst binders at the bottom of the ranking. Nevertheless the overall ranking of the ligands is not in line with the experimental order (results not shown). There may be various reasons for this outcome, some of which may be related to deficiencies in the pose generation. In this regard, we believe that these results could be improved by the use of a MM based function in GOLD as a pose generator, a line of work that will be undertaken in our lab in the near future.

In summary, we have presented in this work a protocol that for the first time (in the case of BACE-1), takes into account directly the effect of pH on the native docking performance of a set of fragment-like inhibitors.

The pK_a values of the BACE-1 acidic residues deviate substantially from the estimates for model compounds in solution and display a ligand dependent variability, especially in the case of the Asp dyad residues, a result that should be taken into account in docking based ligand screening campaigns.

The biggest influence on the hit rate success is produced by the assignment of a charge state to the inhibitor and the choice of pH value. The enrichment provided by assigning a positive charge to the inhibitor probably is the result of a polar micro-environment created in part by the Asp dyad, which enables the ligand ionisable fragment to keep or increase its pK_a value predicted in solution. In one case (ligand 3H0BS) we have shown that our calculations have enabled us to predict an approximate pK_a figure for the ionisable fragment of the inhibitor, and in some other cases our protocol has allowed us to identify the most likely protonated N atom in charged inhibitors.

As seen from our results, the highest success rate is reproduced at a pH close to neutral. This outcome stands to reason and supports our pK_a assignment since the observed poses (obtained by X-ray crystallography) were obtained at this pH value. Nevertheless, most of the inhibitor binding assays for BACE-1 are performed at acidic pH values, where the enzyme has its optimal activity. Preliminary results indicate that at the enzyme's optimal pH our protocol is able to cluster the experimentally observed best binders at the top of the ranking, and the worst binders at the bottom. It would be desirable to perform the screening campaigns at this range of pH, since the candidate ranking position probably changes with this medium acidity. Presently, we are looking for modifications of the protocol that will allow for screening campaigns at the enzyme's optimal pH value. Our calculations on BACE-1 bound to fragments (presented here) indicate that at pH 4.5, the Asp dyad monoprotonated charge state (protonated at Asp 32) is the most prevalent. Nevertheless, as seen from Table 2 and our previous calculations on peptidomimetic inhibitors bound to BACE-1 [16], other options (e.g., diprotonated Asp dyad) are possible. Hence, an option aimed at enriching the docking results could be based

Author's personal copy

on a ensemble docking with a set of protein structures that contain our most commonly predicted Asp dyad protonation states and include the protonation state for the other acidic residues at pH 4.5. Ideally, the pose screening should be carried out with MM protocols that allow for the flexibility of the active site residues, since we believe it will enhance the success rate.

Finally, we have found a possible rationale for the poor docking performance of some ligands across the board irrespective of the docking protocol used. The results indicate that the worst 'behaved' compounds have few anchoring interactions with the active site residues than those that have high success rates, missing HB contacts with one or both residues of the Asp dyad. This result could be used in the screening campaigns to weed out fragments that do not attain a certain number of anchoring interactions and hence could produce false negatives poses.

Acknowledgments This work was supported by financial aid from the Xunta de Galicia (Grant PGIDIT 10CSA209063PR) and Ministerio de Educación y Ciencia fellowship to J.L.D. The Supercomputing Center of Galicia (CESGA) provided computer time.

References

1. Selkoe DJ (2011) Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. Nat Med 17:1060–1065
2. Villaverde MC, González-Louro L, Sussman F (2007) The search for drug leads targeted to the β-secretase: an example of the roles of computer assisted approaches in drug discovery. Curr Top Med Chem 7:980–990
3. Grüninger-Leitch F, Schlatter D, Küng E, Nelböck P, Döbeli H (2002) Substrate and inhibitor profile of BACE (β-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. J Biol Chem 277:4687–4693
4. Coburn CA, Stachel SJ, Li YM, Rush DM, Steele TG, Chen-Dodson E, Holloway MK, Xu M, Huang Q, Lai MT, DiMuzio J, Crouthamel MC, Shi XP, Sardana V, Chen Z, Munshi S, Kuo L, Makara GM, Annis DA, Tadikonda PK, Nash HM, Vacca JP, Wang T (2004) Identification of a small molecule nonpeptide active site β-secretase inhibitor that displays a nontraditional binding mode for aspartyl proteases. J Med Chem 47:6117–6119
5. Murray CW, Callaghan O, Chessari G, Cleasby A, Congreve M, Frederickson M, Hartshorn MJ, McMenamin R, Patel S, Wallis N (2007) Application of fragment screening by X-ray crystallography to β-secretase. J Med Chem 50:1116–1123
6. Congreve M, Aharony D, Albert J, Callaghan O, Campbell J, Carr RAE, Chessari G, Cowan S, Edwards PD, Frederickson M, McMenamin R, Murray CW, Patel S, Wallis N (2007) Application of fragment screening by X-ray crystallography to the discovery of aminopyridines as inhibitors of β-secretase. J Med Chem 50:1124–1132
7. Edwards PD, Albert JS, Sylvester M, Aharony D, Andisik D, Callaghan O, Campbell JB, Carr RA, Chessari G, Congreve M, Frederickson M, Folmer RHA, Geschwindner S, Koether G, Kolmodin K, Krumrine J, Mauger RC, Murray CW, Olsson LL, Patel S, Spear N, Tian G (2007) Application of fragment-based lead generation to the discovery of novel, cyclic amidine β-secretase inhibitors with nanomolar potency, cellular activity, and high ligand efficiency. J Med Chem 50:5912–5925
8. Yang W, Fucini RV, Fahr BT, Randal M, Lind KE, Lam MB, Lu W, Lu Y, Cary DR, Romanowski MJ, Colussi D, Pietrak B, Allison TJ, Munshi SK, Penny DM, Pham P, Sun J, Thomas AE, Wilkinson JM, Jacobs JW, McDowell RS, Ballinger MD (2009) Fragment-based discovery of nonpeptidic BACE-1 inhibitors using tethering. Biochemistry 48:4488–4499
9. Kuglstatter A, Stahl M, Peters JW, Huber W, Stihle M, Schlatter D, Benz J, Ruf A, Roth D, Enderle T, Hennig M (2008) Tyramine fragment binding to BACE-1. Bioorg Med Chem Lett 18:1304–1307
10. Wang YS, Strickland C, Voigt JH, Kennedy ME, Beyer BM, Senior MM, Smith EM, Nechuta TL, Madison VS, Czarniecki M, McKittrick BA, Stamford AW, Parker EM, Hunter JC, Greenlee WJ, Wyss DF (2010) Application of fragment-based NMR screening, X-ray crystallography, structure-based design, and focused chemical library design to identify novel μM leads for the development of nM BACE-1 (β-site APP cleaving enzyme 1) inhibitors. J Med Chem 53:942–950
11. Madden J, Dod JR, Godemann R, Kraemer J, Smith M, Biniszkiewicz M, Hallett DJ, Barker J, Dyekjaer JD, Hesterkamp T (2010) Fragment-based discovery and optimization of BACE1 inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 20:5329–5333
12. Stachel SJ, Coburn CA, Rush D, Jones KLG, Zhu H, Rajapakse H, Graham SL, Simon A, Holloway MK, Allison TJ, Munshi SK, Espeseth AS, Zuck P, Colussi D, Wolfe A, Pietrak BL, Lai MT, Vacca JP (2009) Discovery of aminoheterocycles as a novel β-secretase inhibitor class: pH dependence on binding activity part 1. Bioorg Med Chem Lett 19:2977–2980
13. Huang D, Lüthi U, Kolb P, Cecchini M, Barberis A, Caflisch A (2006) In silico discovery of β-secretase inhibitors. J Am Chem Soc 128:5436–5443
14. Polgár T, Keserü GM (2005) Virtual screening for β-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228. J Med Chem 48:3749–3755
15. Polgár T, Magyar C, Simon I, Keserü GM (2007) Impact of ligand protonation on virtual screening against β-secretase (BACE1). J Chem Inf Model 47:2366–2373
16. Domínguez JL, Christopeit T, Villaverde MC, Gossas T, Otero JM, Nyström S, Baraznenok V, Lindström E, Danielson UH, Sussman F (2010) Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1. Biochemistry 49:7255–7263
17. Sussman F, Otero JM, Villaverde MC, Castro M, Domínguez JL, González-Louro L, Estévez RJ, Estévez JC (2011) On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in β-secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors. J Med Chem 54:3081–3085
18. Kacker P, Masetti M, Mangold M, Bottegoni G, Cavalli A (2012) Combining dyad protonation and active site plasticity in BACE-1 structure-based drug design. J Chem Inf Model 52:1079–1085
19. Barman A, Prabhakar R (2012) Protonation states of the catalytic dyad of β-secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: a molecular docking study. J Chem Inf Model 52:1275–1287
20. Discovery Studio, version 2.1, Accelrys Inc., San Diego, CA
21. Spassov VZ, Yan L (2008) A fast and accurate computational approach to protein ionization. Protein Sci 17:1955–1970
22. Im W, Lee MS, Brooks CL III (2003) Generalized born model with a simple smoothing function. J Comput Chem 24:1691–1702
23. SciFinder results calculated using ACD/Labs software V11.02. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON
24. GOLD, version 5.1. Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge

Author's personal copy

25. Jones G, Willett P, Glen RC (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. J Mol Biol 245:43–53
26. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. J Mol Biol 267:727–748
27. Baxter CA, Murray CW, Clark DE, Westhead DR, Eldridge MD (1998) Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. Proteins 33:367–382
28. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP (1997) Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. J Comput Aided Mol Des 11:425–445
29. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn M, Murray CW, Taylor RD (2003) Improved protein-ligand docking using GOLD. Proteins 52:609–623
30. Korb O, Stützle T, Exner TE (2009) Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. J Chem Inf Model 49:84–96
31. Hoffmann D, Kramer B, Washio T, Steinmetzer T, Rarey M, Lengauer T (1999) Two-stage method for protein-ligand docking. J Med Chem 42:4422–4433
32. Gleeson MP, Gleeson D (2009) QM/MM as a tool in fragment based drug discovery. A cross-docking, rescoring study of kinase inhibitors. J Chem Inf Model 49:1437–1448
33. Momany FA, Klimkowski VJ, Schäfer L (1990) On the use of conformationally dependent geometry trends from ab initio dipeptide studies to refine potentials for the empirical force field CHARMM. J Comput Chem 11:654–662
34. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. J Comput Chem 4:187–217
35. Verdonk ML, Giangreco I, Hall RJ, Korb O, Mortenson PN, Murray CW (2011) Docking performance of fragments and drug like compounds. J Med Chem 54:5422–5431
36. Graves AP, Shivakumar DM, Boyce SE, Jacobson MP, Case DA, Shoichet BK (2008) Rescoring docking hit lists for model cavity sites: predictions and experimental testing. J Mol Biol 377:914–934
37. Brenk R, Vetter SW, Boyce SE, Goodin DB, Shoichet BK (2006) Probing molecular docking in a charged model binding site. J Mol Biol 357:1449–1470

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Receptor Structure Based Design of Multitarget Leads for the Alzheimer's Disease Amyloid Cascade

José L. Domínguez,[1] Fernando Fernández-Nieto,[2] Marian Castro,[3] Marco Catto,[4] M. Rita Paleo,[1,2] Silvia Porto,[2] F. Javier Sardina,[2] José M. Brea,[3] Angelo Carotti,[4] M. Carmen Villaverde,[1]* and Fredy Sussman[1]*

[1] Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain.

[2] Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain.

[3] Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacia Industrial, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain.

[4] Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", 70125-Bari, Italy.

ABSTRACT

Alzheimer disease is a neurodegenerative pathology with unmet clinical needs. A highly desirable approach to this syndrome would be to find a single lead that could bind to some or all biomolecules that participate in the amyloid cascade, the most accepted route for Alzheimer disease genesis. In order to circumvent the challenge posed by the sizable differences in the binding sites of the molecular targets we propose a computer assisted protocol based on a pharmacophore and a set of required interactions with the targets, screened by a combination of docking and molecular dynamics protocols. The original scaffold allowed us to identify a set of carbazole containing compounds that initially showed affinity only for the cholinergic targets in experimental assays. Two cycles of design based on our protocol led to a new set of analogues that were synthesized and assayed. The assay results revealed that the designed inhibitors improve their affinity for BACE-1 by more than three orders of magnitude, as well as displaying amyloid aggregation inhibition and affinity for AChE and BuChE, a result that led us to a group of multi-target candidates that interrupt the amyloid cascade while having a positive effect at the cholinergic level. The results have a bearing on issues like the substitution pattern and the charge state for the best leads and have allowed us to propose a hypothesis for the way these ligands interfere in the amyloid aggregation.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD), a cerebral neurodegenerative pathology that is the main cause of dementia in older people, is characterized by the progressive formation of insoluble amyloid plaques and fibrillary tangles. In spite of the enormous efforts carried out by academic institutions and pharmaceutical industry, AD is an illness with unmet needs since the only drugs available in clinic (i.e., Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors and a NMDA receptor antagonist) have a palliative effect and do not modify the course of the disease.[1]

The most accepted hypothesis for the origin of AD is the one related to the amyloid cascade, which singles out the aggregates and fibrils of the amyloid peptide (Aβ, a peptide of 40 or 42 residues) as the cause of AD, since their presence interrupts the synaptic connections and precludes the right inter-neuron orientation.[2,3] The Abeta peptides are produced by the hydrolysis of the amyloid precursor protein (APP) by two aspartic proteases (γ-secretase and BACE-1). The last decade has witnessed an all out effort to discover inhibitors of these two enzymes that could become drug leads for the treatment of AD, but all the candidates have failed either at pre-clinical or clinical stages.[3] The inhibition of Aβ peptide aggregation has become an important target for drug lead discovery in itself, although no Abeta aggregation inhibitor has surpassed the clinical assays either. On the other hand Inestrosa et al.[4] have shown that the peripheral anionic site (PAS) in AChE could be a therapeutic target, since it is a nucleation site for the amyloid Abeta peptide aggregation and hence its inhibition could hinder this process. Finally, the leads that bind AChE, could also bind butirylcholinesterase (BuChE), and hence have a bearing on the cholinergic pathway by precluding the hydrolysis of acetylcholine and probably enhancing (albeit temporarily) cognition in AD patients.

The multiplicity of amyloid cascade AD targets (described above) opens the door to a new approach towards single molecule polypharmacology, which entails the search of a molecule that could bind to all or some targets of the amyloid cascade. This novel paradigm which deviates radically from the one target one molecule strategy has been only scantily researched for the amyloid cascade.[5-7] The major hurdle in the search for multitarget leads lay on the substantial structural and sequence specificity differences amongst the binding sites of the amyloid cascade targets, which hinders drastically this therapeutic strategy. Herein we postulate the existence of a possible pharmacophore for multitarget approach to the amyloid cascade of AD, which could be used as the starting

point for leads that could bind to the selected amyloid targets. We have identified in the literature some candidates bearing the traits of our proposed scaffold.[8] Nevertheless, the results of our experimental binding assays indicate that although these compounds bind AChE, they have a modest fibril inhibition and display much lower affinities for BACE-1. Our main endeavour in this work was to generate higher generation ligands with better affinities for the all the amyloid cascade targets. For this sake we developed a protocol that relies on molecular docking based screening for the enzyme targets and molecular dynamics simulations for peptide aggregation in order to search for more potent analogues of our starting candidates. The main novelty of the docking protocol is that the hit poses should comply with the set of inhibitor-protein interactions assigned to our pharmacophore. Review of the predicted docking poses in AChE and BACE-1 revealed possible ways of enhancing binding affinity. Two cycles of design based on our protocol lead to a new set of analogues that were synthesized and assayed. The assay results revealed that the designed inhibitors improve their affinity for BACE-1 and amyloid aggregates by more than three orders of magnitude, as well as showing affinity for AChE and BuChE, a result that led us to a group of truly multi-target candidates that interrupt the amyloid cascade while having a positive effect at the cholinergic level.

Furthermore, our results have allowed us to explore some basic questions that relate to molecular recognition issues in the different amyloid cascade targets, including the charge state of the BACE-1 main anchoring group and the way in which the best leads may interrupt the amyloid peptide aggregation.

1.1 Multitarget amyloid cascade pharmacophore.

Our pharmacophore was built by identifying the specific moieties that are recognized by the binding pockets of the different amyloid cascade targets. For instance, an essential feature in BACE-1 inhibitors is a functional group (such as hydroxyethylene, hydroxylamine, guanidium, etc.) which is able to interact through hydrogen bonds and ion pairs with the Asp dyad, the catalytic machinery of this enzyme.[9] Our choice for this kind of functionality has been based on recent studies in our lab that have identified the hydroxylamine as an Asp dyad anchor which favours good performance at cellular level.[10,11] On the other hand, an overview of the AChE inhibitors indicate that many of them contain one or two aromatic moieties which interact through π-stacking interactions with clusters of aromatic residues present both in the catalytic anionic site

(CAS) and in the peripheral binding site (PAS).[12] Both AChE binding sites are separated by a long gorge. Hence, our ideal AChE inhibitor should include an optimum length spacer that will connect the aromatic moiety residing in the CAS with the one at the PAS. If we accomplish this aim, the resulting lead should have both a palliative effect on AD and hinder amyloid aggregation. Finally, some of the amyloid aggregation inhibitors share with the AChE ligands a common feature, that is, the presence of aromatic groups that target some of the residue clusters rich in aromatic residues present in the amyloid peptide (such as the LVFFA segment). Hence, a multi-target pharmacophore and its possible interactions expected in the amyloid cascade binding sites could be described by a scheme such as the one presented in Figure 1.

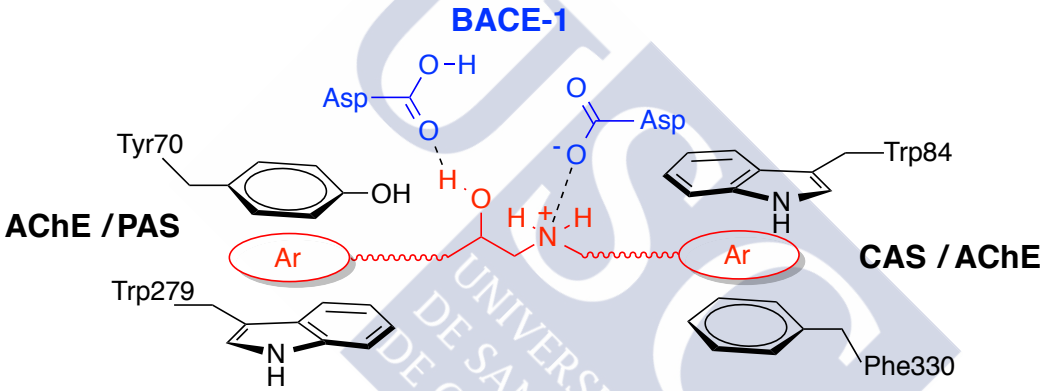


Figure 1. Schematic view of our multi-target pharmacophore (red) bound to the Asp dyad of BACE-1 (blue) and to the CAS and PAS of *Tc*AChE (black).

The search for candidates based on the pharmacophore shown in Figure 1 lead us to find some compounds (**1**) (see Figure 2) with neurogenerative and neuroprotective properties in mice.[8] Nevertheless, the molecular therapeutic targets for these compounds have not been identified. The stated aim of the study that led to these compounds in the first place was to find analogues of dimebon, a carbazole derivative that in itself showed good promise in AD assays in animals but failed in phase three clinical trials.[13] Moreover, other carbazole derivatives have shown to be good Abeta aggregation inhibitors.[14] As seen from structure **1** in Figure 2, these compounds present all of the structural characteristics that make them good leads for all amyloid cascade targets. On one hand the hydroxyethylamine moiety provides an anchor for BACE-1 binding, while the aromatic moieties on both ends (carbazole and substituted phenyl groups) could be a source of affinity of these compounds for AChE and Aβ peptide oligomers. Based on

this information we decided to investigate if the original group of compounds (**1**) owed its beneficial properties at the CNS level to their binding to some of the amyloid cascade targets, and weather we could produce analogues with better affinity for a wider range of amyloid cascade targets.

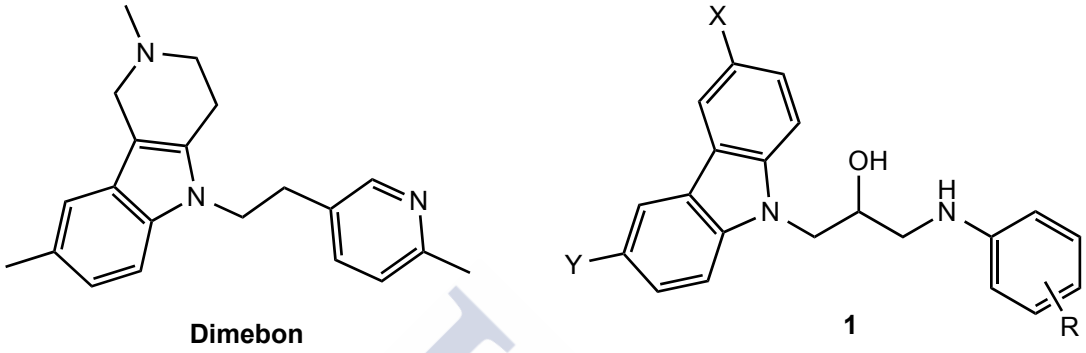


Figure 2. Structure of dimebon and its analogues (**1**) studied in this work.

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1 Docking potocols. We carried out the docking simulations with the suite of modules resident in the program GOLD.[15] For each docking run we employed a minimum of 100,000 and a maximum of 1,250,000 genetic generated poses. We scored the poses with three of the scoring functions resident in GOLD (i.e., GoldScore,[16,17] ChemScore[18-20] and ChemPLP[21]).

2.1.1 Docking calculations to BACE-1. One of the most outstanding structural features of the active site of BACE-1 is a residue segment that forms a flap (residues 69 to 75) whose conformational variability allows for a great variety of binding poses for those inhibitors differing in size and shape.[9] This loop, which forms part of the S1 pocket, closes in onto the active site during substrate catalysis. There are inhibitors that bind explicitly to the flap avoiding its closure and hence hampering catalysis. Perusal of the many BACE-1-inhibitor complex structures indicates that the flap presents a wide variety of openings depending on the inhibitor. In order to take into account the flap variability in our docking calculations, we have carried out our docking simulations with three protein templates that differ in the opening of this loop. The first of these protein structures comes from the complex between BACE-1 and the peptide-mimetic inhibitor **OM99-2** (PDB entry 1FKN) and has a closed flap.[22] The second structure has a non-peptidic inhibitor bound to the enzyme with a middle range opening of the flap (PDB entry 3KMY),[23] while the last template was obtained from the unbound structure of BACE-1, and has a fully opened flap (PDB entry 1W50).[24] Figure 3 exhibits the

superposition of these three structures with the flap structures displayed in different colors.

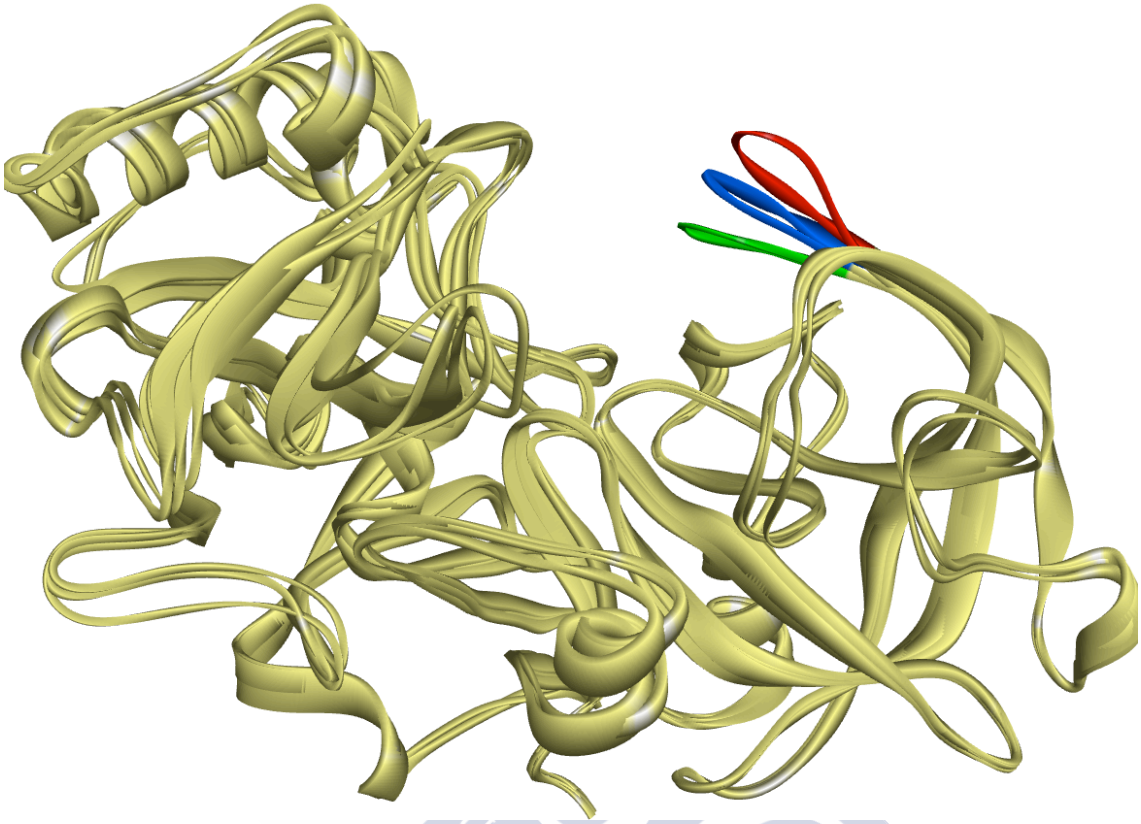


Figure 3. Superimposition of 1FKN, 3KMY and 1W50 protein ribbon structures. The flap loops are colored in green, blue and red respectively.

As a first step we cleaned up the target structures mentioned above, eliminating the crystallographic water molecules, discarding alternative conformations and adding hydrogen atoms, by using the Discovery Studio (DS) modules.[25] We defined the targeted binding site for GOLD docking to these proteins as all the atom residues that were within 6Å of the inhibitor in the 3KMY complex. Our previous studies, which combined SPR binding experiments with molecular mechanics based calculations, predicted that the Asp dyad in BACE-1 has a monoprotonated state (with the charge localized on Asp 228) when bound to compounds with a hydroxyethylamine moiety.[10] Thus, we assigned this Asp dyad state to BACE-1 in our BACE-1 docking screening calculations.

For each of the structures differing in the flap opening, we then performed docking calculations with one of the three scoring functions (ChemScore, GoldSCore and ChemPLP). In each of the runs we searched for the presence of a single hit pose amongst the top ten docking resulting poses. We define a hit as the pose that will fulfill the hydrogen bond pattern between the hydroxyethylamine fragment and the Asp dyad

shown for our pharmacophore in Figure 1. Global success rates for every compound candidate were calculated by adding up the number of single hits of the docking simulations carried out with the three scoring functions for our three protein templates differing in the flap opening described above.

2.1.2 Docking simulations to AChE. For the docking predictions to this target we used the X-ray structure of *Torpedo californica* (*Tc*AChE) complexed with a bis-tacrine analogue (PDB entry 1ODC).[26] A close up of the binding pose is shown in Figure 4.

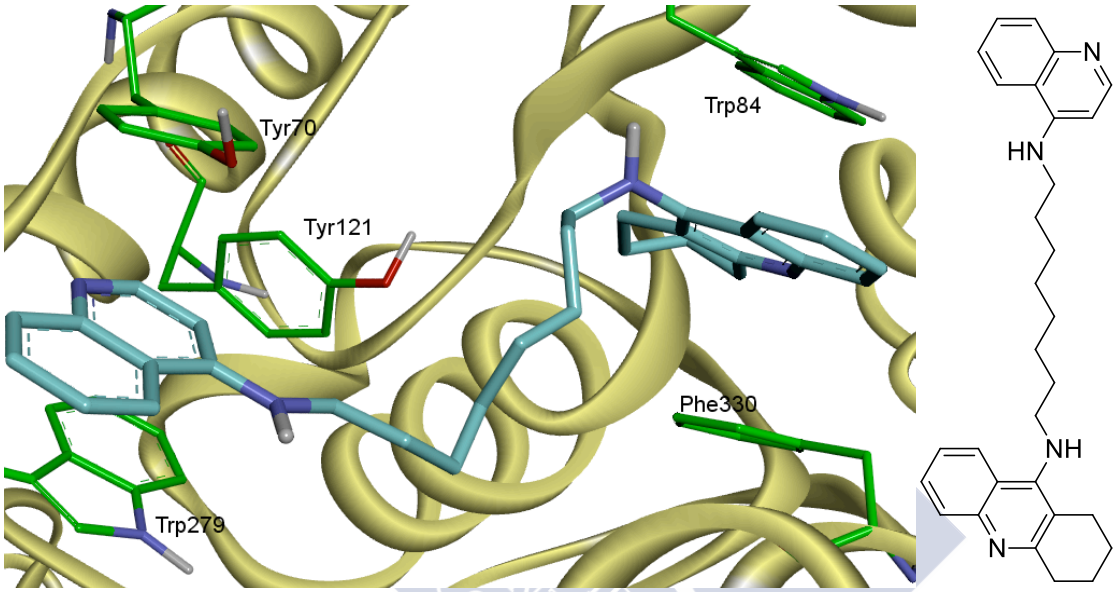


Figure 4. Close up to the binding of the bis-tacrine analogue indicated to both binding sites (CAS and PAS) in *Tc*AChE (from PDB entry 1ODC). The inhibitor is shown in blue and the aromatic residues in green. Notice the π-π interactions between the aromatic moieties and the side chains of residues Trp 84 and Phe 330 at the CAS and with residues Tyr 70 and Trp 279 at the PAS.

In the same way as for BACE-1, we cleaned up the target structure (PDB id 1ODC), eliminating the crystallographic water molecules, discarding alternative conformations and adding hydrogen atoms, by using the Discovery Studio (DS) modules.[25] We defined the binding site as all the AChE atom residues that lay at 6 Å from the ligand of this complex (i.e., the bis-tacrine analogue). Again, the docking conformations generated by the genetic algorithm were evaluated by the same scoring functions used for BACE-1. In each run the top ten poses were screened for compliance with the face-to-face π-stacking interactions that will optimize the inhibitor affinity both at the CAS and PAS in AChE, as shown in Figure 1 and exemplified by the bis-tacrine analogue in Figure 4. In the same way as in BACE-1 the hit success rate was determined by searching for a hit

amongst the top ten poses for the docking simulations evaluated with our three scoring functions. Global success rates were calculated by adding up the number of single hits.

2.2 Aβ aggregation inhibition protocol. As we explained in the introduction, one of the therapeutic targets is the inhibition of the Aβ peptide oligomerization that leads to the neuronal toxic species. These peptides do not have a unique binding site for the ligands as in the case of other AD amyloid cascade enzymatic targets. Rather, there are multiple binding states that share common sequence motifs depending on the nature of the ligand. For instance, some aromatic moiety inhibitors tend to bind to aromatic residue clusters present in the LVFFA segment.[27] Hence, many *in silico* aggregation inhibition studies merge docking protocols with molecular dynamics (MD) simulations.[28] We have explored a different approach recently developed by the group of Caflisch.[27a] It consists in analyzing lengthy MD simulations of a segment of the Aβ peptide (Aβ12-28) in the presence of a given candidate. This peptide fragment has been chosen for several reasons. Firstly, the first 11 residues were omitted since they lack any definite secondary structure in some NMR amyloid aggregate structures.[29] Moreover, the selected segment contains one of the regions (LVFFA) around which a beta hairpin, the template for Abeta aggregation forms, and is also one of the ligand's binding spots for a number of ligands.[27] Finally, MD simulations on shorter Abeta peptides would require less computer resources for converged calculations.

Our extensive MD calculations were carried out with the PARAM-19 force field,[30] which employs an extended atom approximation for all carbon atoms. Protonation states of all titratable residues were considered at neutral pH. In particular the side chains of the His residues were assigned a neutral charge, whereas the basic residues (Arg/Lys) and the acidic residues (Asp/Glu) were assigned either a positive or a negative charge respectively. We used an implicit solvation protocol called FACTS (Fast Analytical Continuum Treatment of Solvent), an efficient generalized Born (GB) implicit solvation model developed in Caflisch's group,[31] which includes a solvent accessible surface of the solute for the non-polar contribution.

MD Simulations were carried out with periodic boundary conditions at a fixed peptide concentration of 2.5 mM (87 Å cubic simulation box) using the Langevin integrator at low friction (coefficient of 0.15 ps^{-1}) and at a temperature of 300 K. Using a time step of 2 fs, for each system, we performed five independent runs which added up to a 5 μs trajectory. Each of the starting structures contained the peptide in an extended

conformation together with the inhibitor candidate in a different position. We also used as a reference the simulations of a peptide with the known aggregation inhibitor 9-10 antraquinone and the ligand-free peptide. The initial structures were subject to two energy minimization runs, which began by a 1ps steepest descent run followed by 100 ps conjugate gradient calculation. In each case the gradient tolerance was of 0.001 kcal/(mol·Å^2). Then, heating stage and a thermal MD equilibration stages spanning 0.5 ns each were carried out, followed by the production stage described above.

2.3 Synthesis of inhibitors and experimental inhibition assays. Experimental procedures for the synthesis and chemical characterization of compounds **1a-1f**, **3e**, **3f**, **4a-4c**, **5a-5c** and **7a-7c**, as well as the protocols for their experimental evaluation as inhibitors of BACE-1, AChE, BuChE and Abeta aggregation, are reported in the supporting information.

3. RESULTS

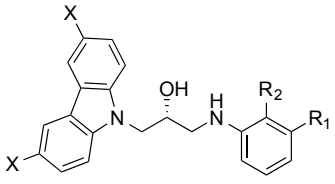
3.1. First lead optimization: Carbazole derivatives.

3.1.1. BACE-1 ligand screening

The first set of compounds studied were the carbazole derivatives bearing an aniline moiety with a substituent either in *ortho* or *meta* positions, that showed neuro-protective and neuro-generative activity in mice.[8] The docking results data for some of these compounds are listed in Table S1 in the supporting info, while the global docking success rate (see methods section for details) is shown in Figure 5. As seen from Figure 5 and Table S1, the compounds that have a methoxy substituent at the aniline either in the *ortho* (compound **1d**) and at the meta position (compound **1g**) are the ones that show the widest consensus as a possible BACE-1 inhibitor. The better fit displayed by these compounds could be the result of reduced steric clashes, given that they are the smallest candidates in this list. For the same reason, our predictions indicate that the smaller ligands bind to BACE-1 with any of the three flap openings (see Table S1). Nevertheless, given their size, it is doubtful that these ligands could span both the CAS and PAS in AChE, and hence become multitarget leads

Perusal of the results in Figure 5 and Table S1 shows that the available hits are obtained almost exclusively when the docking calculations are carried out with a charged ligand. Actually, only two of the seven compounds (**1e, 1g**) display some hits when neutral. This result is in line with our previous studies which indicate that there is an enrichment

in the number of predicted poses closed to those observed experimentally when the ligand is charged.[32]



1a: X = H, R_1 = H, R_2 = OMe
1b: X = H, R_1 = H, R_2 = OBn
1c: X = H, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
1d: X = Br, R_1 = H, R_2 = OMe
1e: X = Br, R_1 = H, R_2 = OBn
1f: X = Br, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
1g: X = Br, R_1 = OMe, R_2 = H

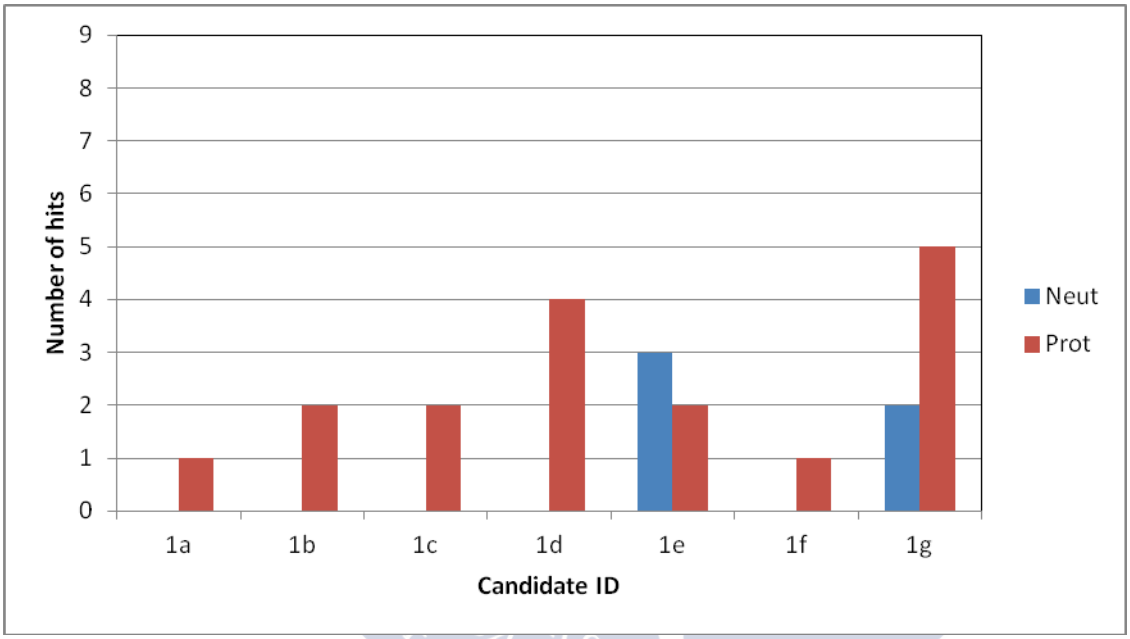
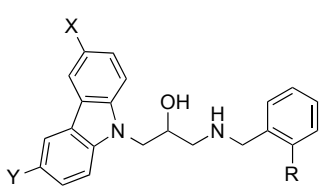
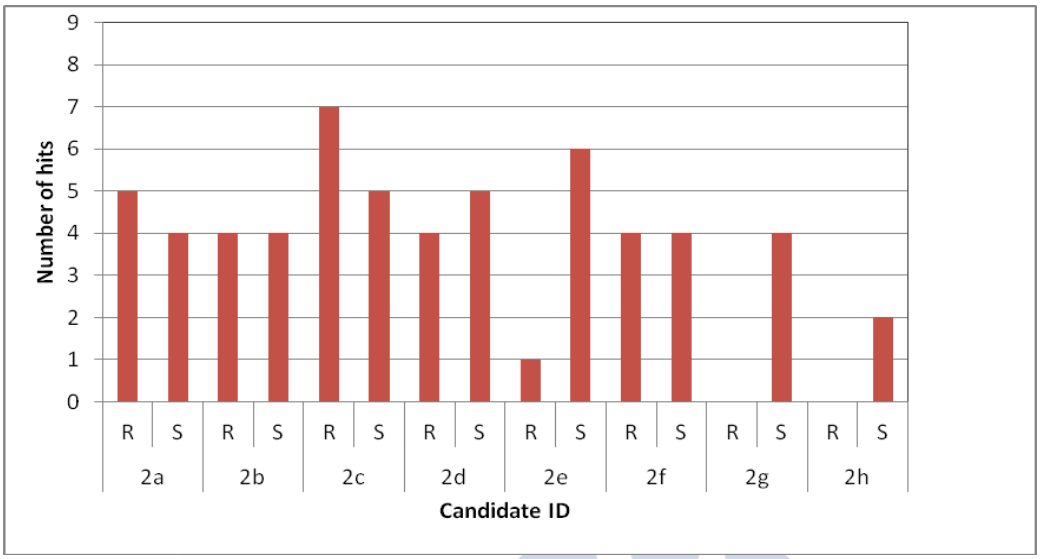


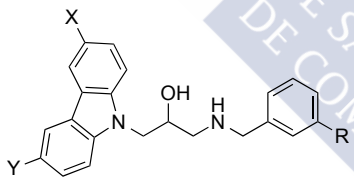
Figure 5. Global docking success rates for BACE-1 as provided by the number of single hits across flap oppenings and docking scoring functions. Neut and Prot indicate weather the ligand is neutral or protonated.

The pK_a of the protonated amino group belonging to the aniline moiety, for these compounds in solution, is ca. 4.7, a value that is close or below the pH at which the binding assays are performed. Replacing the aniline by a benzylamine moiety would likely increase the pK_a value of the amino group and hence the likelihood of being charged, an outcome that probably will boost the number of predicted BACE-1 binders. Figure 6 displays the global hit success for benzylamine containing compounds substituted in *ortho* (upper panel) and *meta* (lower panel). The detailed data for these docking calculations are shown in Tables S2 and S3. Comparison of the number of single hits amongst the top ten exit poses between analogous aniline (Table S1 and Figure 5) and benzylamine compounds (Tables S2/S3 and Figure 6), indicates a substantial hit rate increase for benzylamines above those calculated for the aniline containing compounds, an outcome that validates our design premises.



2a: X = Y = H, R = OMe
2b: X = Y = H, R = OBn
2c: X = Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
2d: X = Y = Br, R = OMe
2e: X = Y = Br, R = OBn
2f: X = Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
2g: X = Br, Y = Me, R = OBn
2h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph





3a: X = Y = H, R = OMe
3b: X = Y = H, R = OBn
3c: X = Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
3d: X = Y = Br, R = OMe
3e: X = Y = Br, R = OBn
3f: X = Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
3g: X = Br, Y = Me, R = OBn
3h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

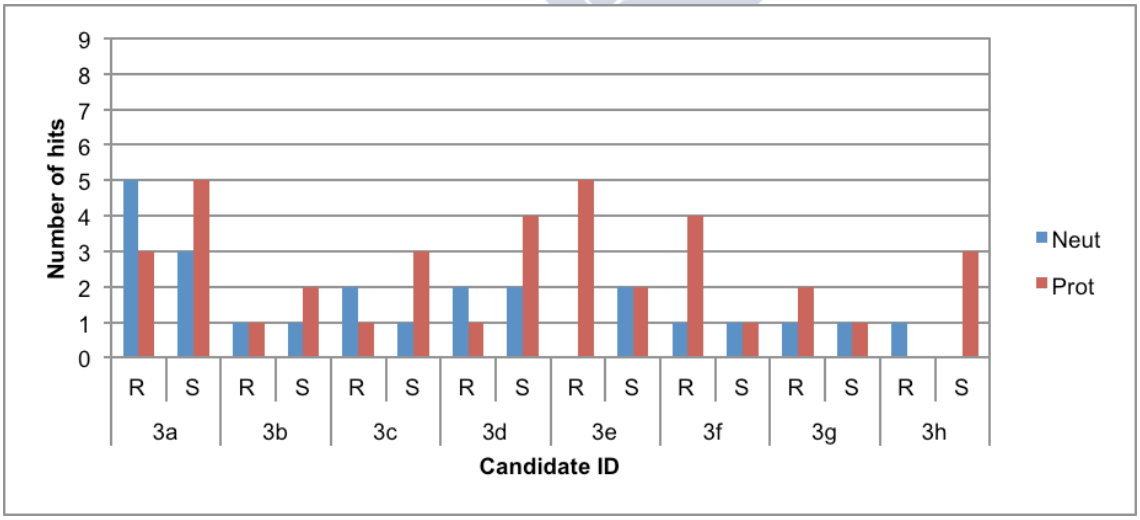


Figure 6. Global hit success that result from the docking to BACE-1 of protonated *ortho* (upper panel) and both neutral and protonated *meta* benzylamines (lower panel).

Perusal of Figure 6 indicates that the benzylamine substitution pattern has also a bearing in the number of possible hits. The results would seem to indicate that the *ortho* is favoured over the *meta* substitution at the benzylamine moiety. For instance amongst the top ten poses, the number single hits with *ortho* substitution is twice the number of hits with the *meta* substitution (see Tables S2 and S3). Nevertheless, there seems to be exceptions (e.g., see compounds **3e** when the hydroxyl group is in the *R* configuration), which had a number of hits comparable to the analogous *ortho* derivative (i.e., compound **2e** when the hydroxyl group is in the *S* configuration).

For the compounds bearing a benzylamine fragment we also analyzed the effectiveness of each steroisomer. The results shown in Figure 6 do not show a clear predilection for a given enantiomer, as changes at the ends of the candidate compounds seem to change the preference. For instance in the case of the compounds containing *meta*-benzylamines, those compounds that bear two Br atoms on the carbazole favour a *R* configuration (compounds **3e** and **3f**), while those that replace both Br atoms by H atoms favour a *S* configuration. Nevertheless, these configuration patterns do not seem to hold for the *ortho*-benzylamine bearing compounds.

3.1.2. AChE ligand screening

Figure 7 displays the global hit rate for protonated anilines and benzylamines (substituted in the *ortho* position), while Figure 8 depicts the number of hits for the compounds bearing benzylamines substituted in *meta*. As seen from these figures, there is a wide consensus amongst the scoring function results, indicating that these compounds are good candidates for AChE inhibitors, in most cases independently of the stereochemistry of the hydroxyl group and the charge of the hydroxylethylamino group. Comparison with the BACE-1 docking results described above indicates that the number of predicted hits for AChE is substantially larger than those for BACE-1, implying that there are fewer hurdles for finding a candidate that will fulfil the scaffold requirements for the former enzyme.

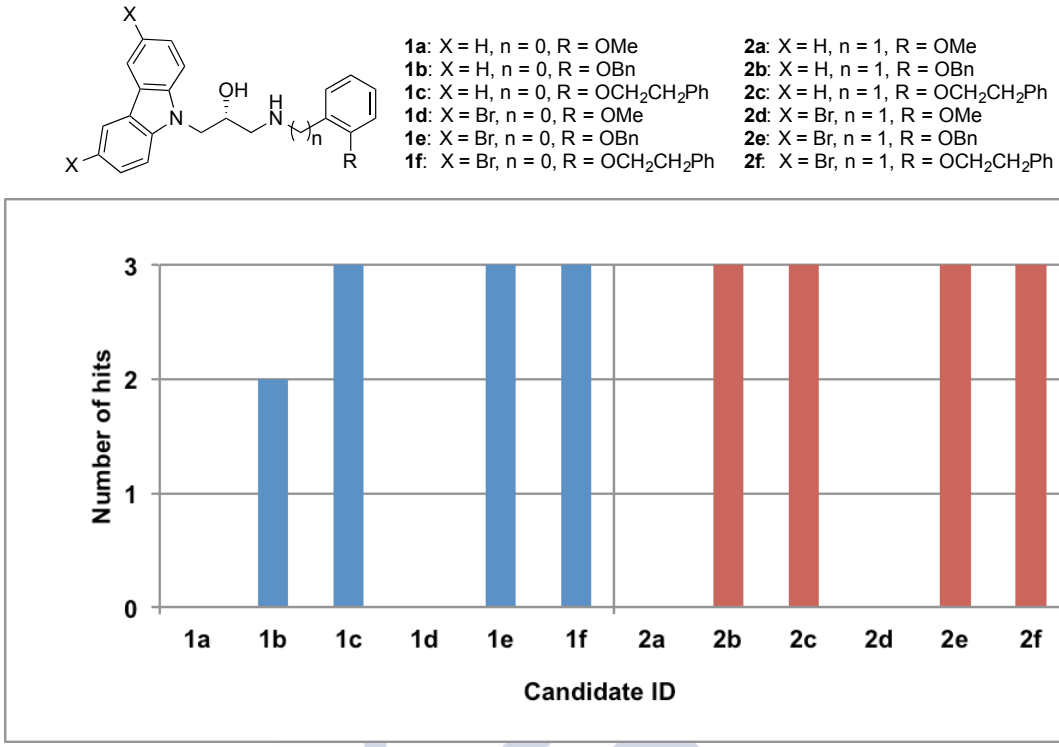


Figure 7. Global hit rate resulting from the AChE docking screening of the protonated *ortho* substituted anilines (left) and benzylamines (right). The hit search was carried amongst the top ten poses resulting from three docking calculations each carried out with a different scoring function (ChemScore, GoldScore and ChemPLP).

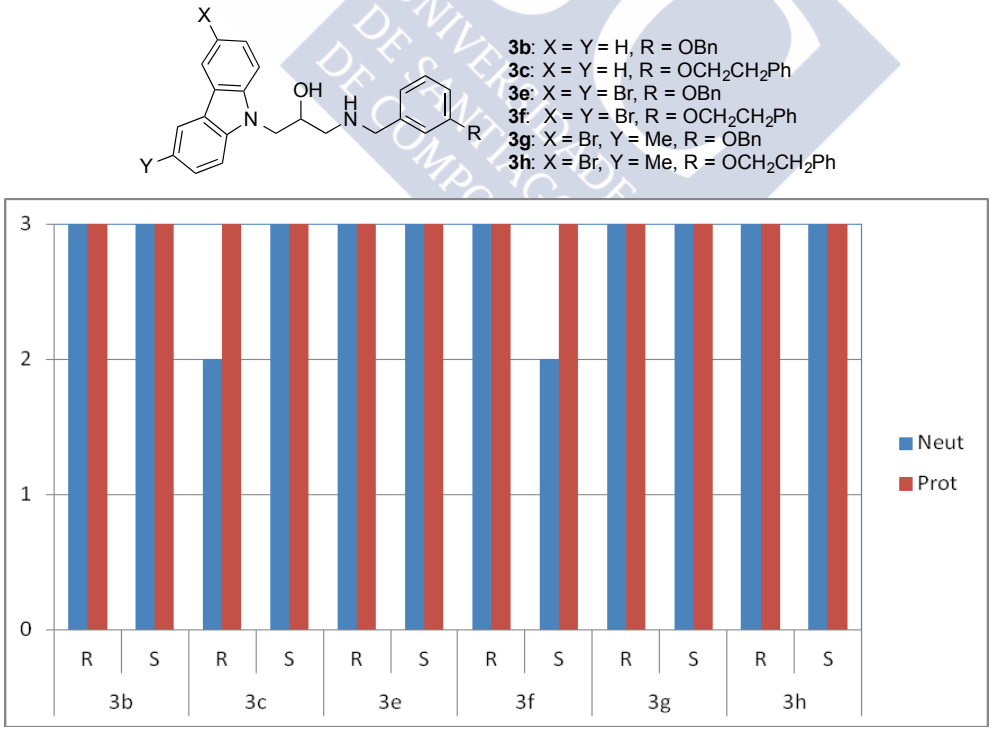


Figure 8. Global hit rate resulting from the AChE docking screening of the compounds with a *meta* substituted benzylamine. For each molecule we studied the effect of the stereochemistry of the hydroxyl group (*R*, *S*) and the protonation state of the amine group.The hit search was carried amongst the top ten poses resulting from three docking calculations each carried out with a different scoring function (ChemScore, GoldScore and ChemPLP).

The scoring function values for aniline and benzylamine containing compounds are listed in Tables S4 and S5. Perusal of Table S4 and Figure 7 indicates that the shorter compounds, like **1a** and **1d** (those bearing a methoxy substituent) have no hit according to our pharmacophore definition, as shown in Figure 1. Scrutiny of the binding poses for a methoxy as compared to a benzyloxy substituted compound (Figure 9) indicates that the former ligands derive their worse performance from their inability to bind both to the CAS and PAS in AChE. As seen from Figure 9 the carbazole moiety interacts in the CAS with residues Tyr 84 and Phe 330 through π stacking interactions. The shorter ligand is not able to reach the PAS in AChE and hence to generate these types of interactions with Tyr 70 and Trp 279.

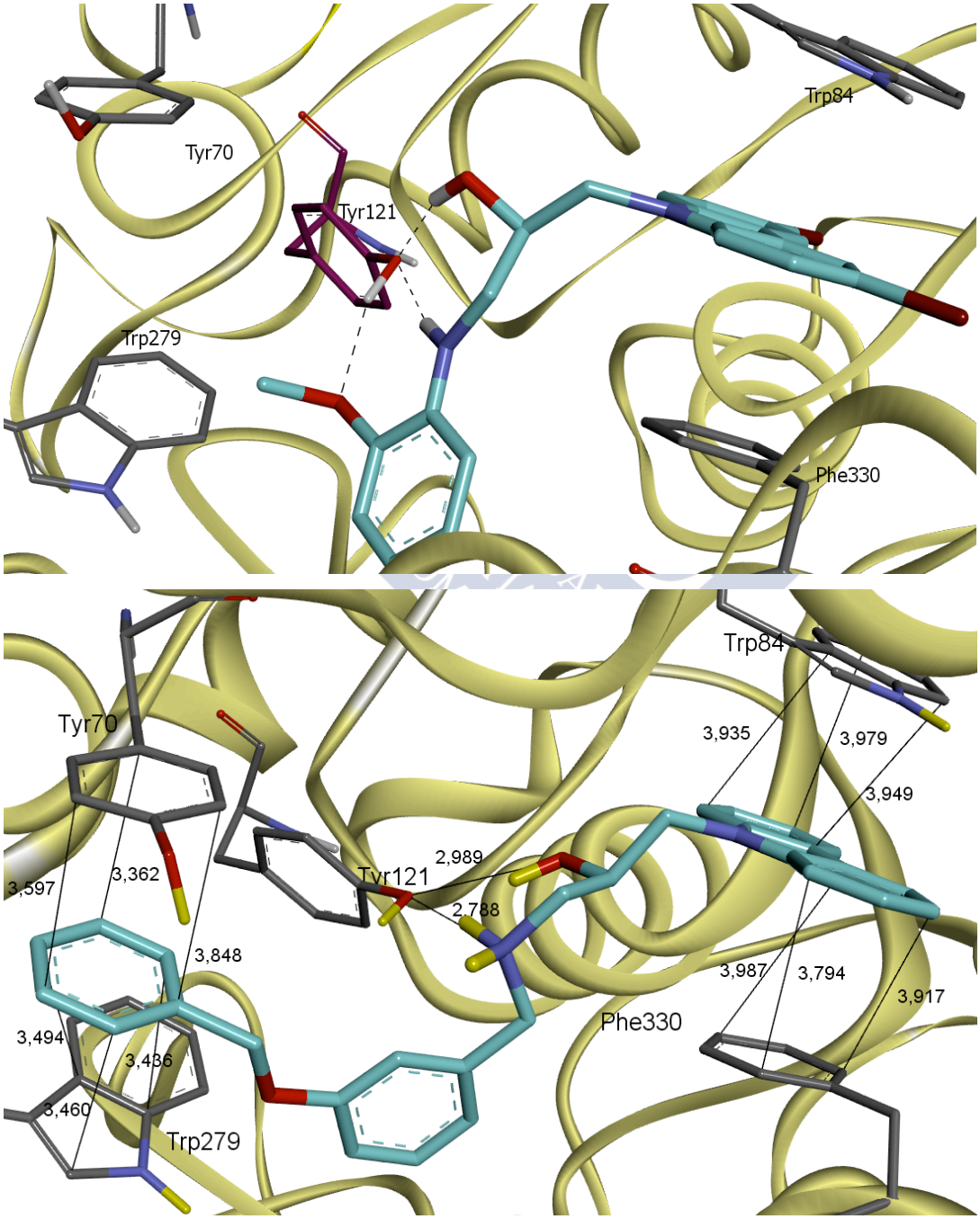


Figure 9. Docking of compounds **1d** (upper panel) and **3b** (lower panel) into AChE.

3.1.3. Inhibitor Aβ12-28 peptide interaction results.

Table 1 lists the residence times for 9,10-antraquinone (a reference compound) and for some carbazole containing compounds, up to 7.5 Å from the peptide. We have also calculated the residence time of these ligands around every residue of the peptide with a cut-off distance of 4.5 Å (see Figure 10) and the residue-residue interaction in the absence and presence of the ligands (see Figure 11). As seen from Table 1, the candidate compounds have a much larger residence time than the reference ligand. Moreover, the selected compounds display a bigger preference (than the reference compound) for the binding hot spots centred on both the His cluster at the N terminal end and on the aromatic cluster found at the LVFFA segment.

Table 1. Fraction residence time for contacts peptide-ligand up to 7.5 Å.

Candidate	Contact Time
1b	0.93
1c	0.90
1d	0.99
1f	0.99
antraquinone	0.36

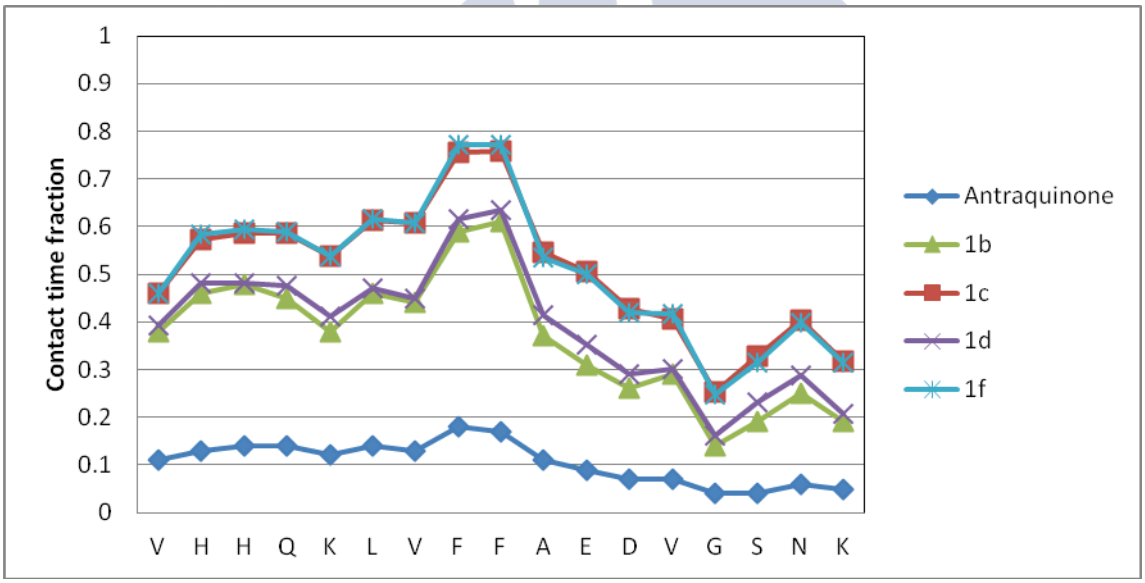


Figure 10. Ligand-peptide residues fraction contact times. Cut-off distance is set at 4.5 Å.

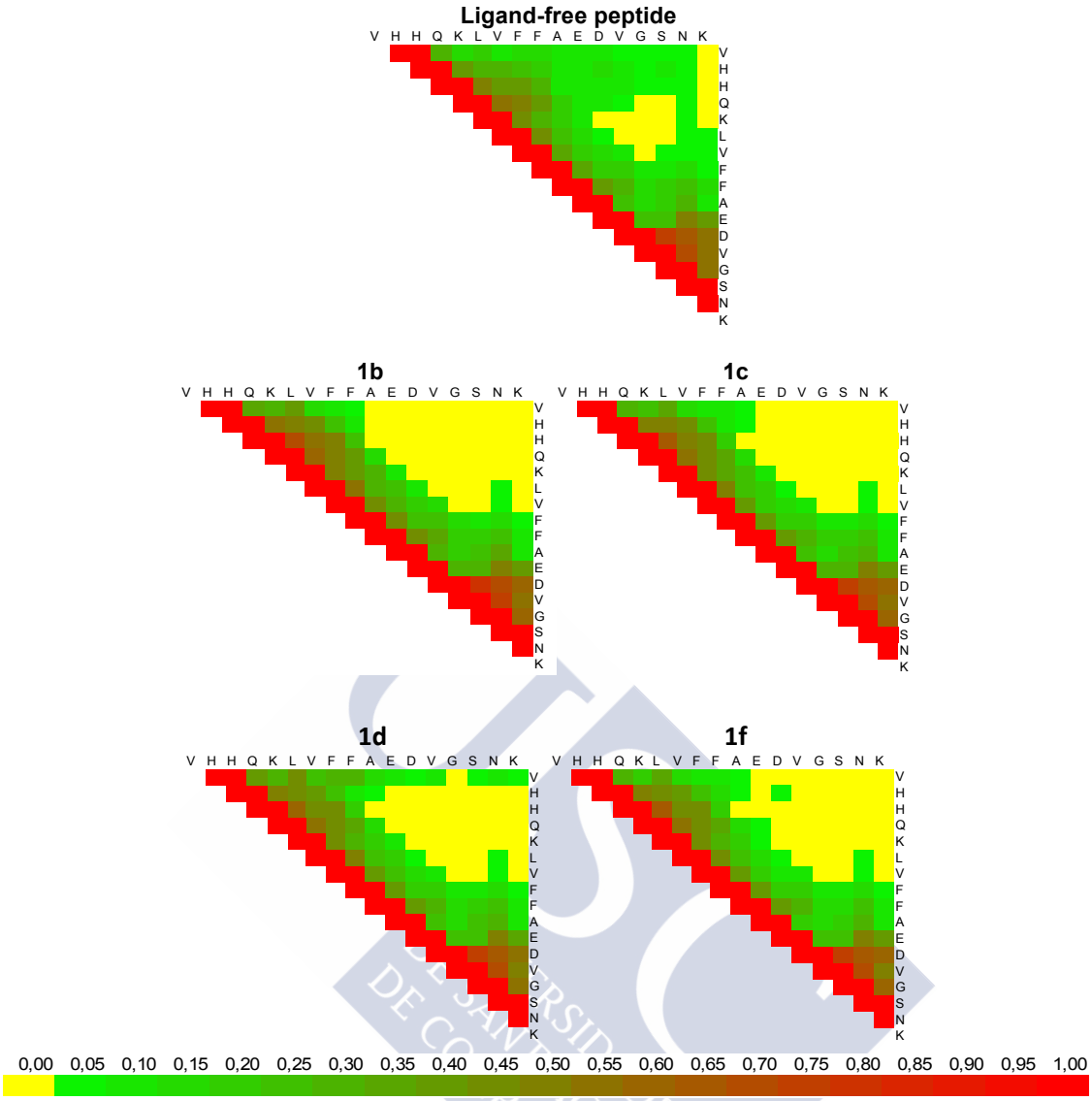
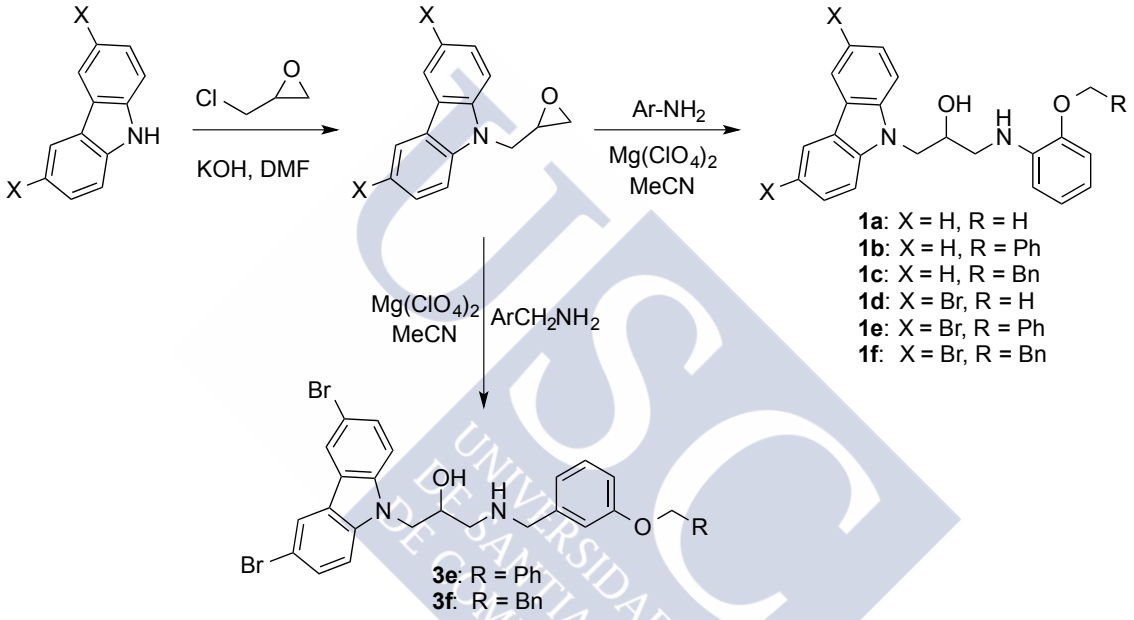


Figure 11. Residue-residue contact map in the absence (top panel) and in the presence of inhibitors. The colour scale shown above indicates the fraction residence times.

An important issue is the effect of the ligand on the secondary structure of the peptide. The Aβ peptide, which originates from APP hydrolysis, originally adopts a helix structure. As amyloid aggregates are formed, there is a change of conformation that leads to a beta hairpin conformation, specifically around the DVGS motif. For instance the structure of a pentamer[29] shows clearly that the peptides organize themselves forming hairpins that aggregate as sheets. As seen from Figure 11, the ligands would seem to partially preclude the formation of this secondary structure motif (turn) in a monomer, a process that may lead to reduced aggregation. Hence, it may be surmised that the residue-residue contact map in the presence of a ligand may give us a measure of its aggregation inhibitory effect of our candidates.

3.1.4. Synthesis and experimental assays for carbazole containing compounds.

The synthesis of several carbazol-containing compounds was carried out following Scheme 1, which includes the list of synthesized molecules. The choice of compounds was guided in many cases by the availability of the reactants. Although in the case of benzylamines the compounds with an *ortho* substituent seem to show a wider consensus as BACE-1 inhibitors across all scoring functions (see Figure 6), they require a more elaborated and expensive chemistry. For this reason, we chose the best scoring candidates with a *meta* substituted benzylamine (**3e** and **3f**).



Scheme 1. Synthetic route and carbazole derivatives synthesized.

The results for the experimental binding assays in BACE-1, AChE and BuChE, as well as the ThT Aβ aggregation inhibition are shown in Table 2. As seen from this table, some of the aniline-containing compounds showed some promise as multitarget inhibitors. For instance, compounds **1e** and **1f** display μM affinity for AChE and Aβ inhibition percentage of ca. 50% at 100 μM peptide concentration, values that are superior to 9,10-antraquinone (30% at 100 μM).[33] On the other side compound **1a**, displays μM binding for BuChE, and 58% percentage of inhibition of the fibril formation. Nevertheless, none of the carbazole and aniline containing compounds resulted in multitarget leads across all the chosen amyloid cascade targets.

Table 2. Experimental results for the multitarget assays.

Compound	*Ee*AChE		hsBuChE		Aβ(1-40)	BACE-1	
	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 100μM	%Inh. @100μM	IC_{50}(μM)
1a	30 ± 1	--	--	6.0 ± 1.0	58 ± 2	1.3 ± 0.3	--
1b	22 ± 1	--	34 ± 1	--	51 ± 5	2.4 ± 1.4	--
1c	49 ± 2	--	33 ± 1	--	36 ± 5	1.5 ± 0.3	--
1d	15 ± 1	--	12 ± 1	--	41 ± 3	1.6 ± 1.5	--
1e	--	7.2 ± 0.4	20 ± 1	--	46 ± 3	0.5 ± 0.3	--
1f	--	7.8 ± 0.2	10 ± 1	--	49 ± 1	0.9 ± 0.9	--
3e	48 ± 1	--	--	1.1 ± 0.2	11 ± 3	--	3.1 ± 0.4
3f	--	14 ± 1	--	7.1 ± 0.7	28 ± 3	--	3.1 ± 0.3

Finally, as seen from this table the benzylamine amine bearing compounds (**3e** and **3f**) have improved their affinity for BACE-1 by three orders of magnitude over the aniline containing compounds. This result validates and supports the outcome of our calculations (see Figures 5 and 6), which indicate that the addition of a CH_2 fragment provides hits across the set of scoring functions used in our calculations. As mentioned before this effect is probably due to the raise in the p*K*a in the bezylamine's amino group, which favours the formation of an ion pair with one of the Asp residues of the active site Asp dyad. These latter compounds (**3e** and **3f**) have improved their affinity for BuChE and **3f** displays as well a micromolar affinity for AChE. Nevertheless, their Abeta aggregation inhibition has dropped below the 30% inhibition displayed by the reference compound (9,10-antraquinone).

3.2. Screening a third generation candidates: Indole based multitarget candidates

The carbazole moiety present in the candidates synthesized and assayed above is quite a bulky group. Perusal of the resulting binding poses showed some steric clashes between the ligand and some protein side chains. The close van der Waals contacts are allowed by the GOLD docking protocol as a way of compensating for the lack of protein flexibility.[15] Figures S1 and S2 display the steric clashes of some ligands with BACE-1 and AChE. An option to avoid the steric clashes altogether will be to search for smaller aromatic groups in place of the carbazol, like an indole. Based on this idea we designed a new generation of multi-target candidates bearing this fragment in one end and in the other end the same aromatic moieties which were already used in the previous sections (substituted anilines and benzylamines). For these ligands we have chosen the OBn substituent for the anilines and benzylamines, since the analysis of the results for the carbazole-containing compounds described above has shown that this substituent

provides the leads with the right length to span the distance from the CAS to the PAS in AChE.

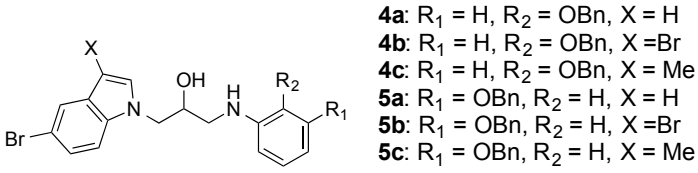
3.2.1. BACE-1 ligand screening

Figure 12 lists the global hit success for the indole based derivatives, while the scoring function values for this set of compounds are listed in Tables S6 and S7. The structural variables analyzed in these figures are the same as in the study of the carbazole derivates in the previous section and include the moiety to which the amino group belongs (aniline or benzylamine), its protonation state, the substitution of the indole group, the substituent position (*ortho* or *meta*) of the other aromatic ring and the stereochemistry of the OH group.

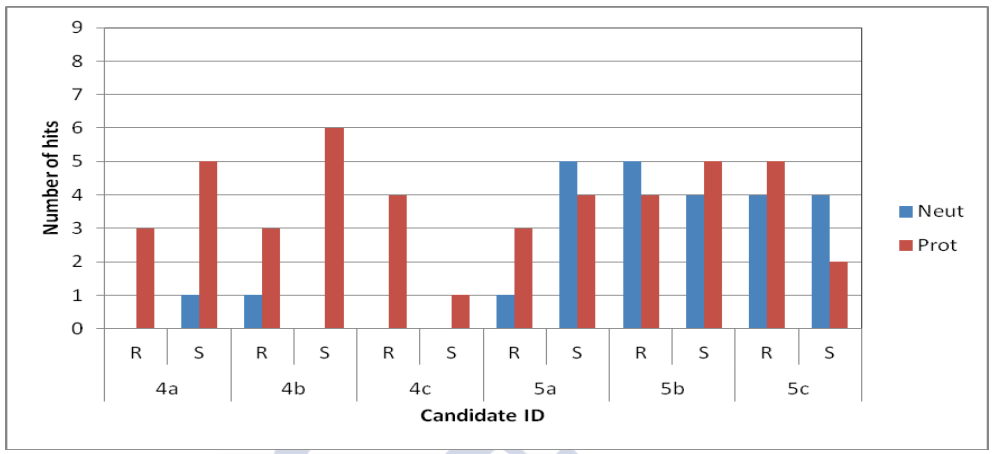
Perusal of our results indicates that the indole based ligands have a higher probability of binding to BACE-1 with a medium open or fully open flap (see Tables S6 and S7). The number of hits with a closed flap is very small, especially when using a ChemPLP scoring function, indicating that these molecules fit in the active site of BACE-1 thanks to the plasticity of its flap.

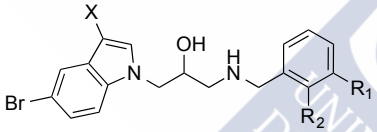
In the case of the carbazole based compounds, the best ranking compounds where those that contained a benzylamine moiety, one that assured the existence of a protonated amino group. A global comparison of the compounds that contain an aniline (see Figure 12, upper panel) with those that contain a benzylamine (Figure 12, lower panel) indicate that the latter present a larger global hit rate, a pattern similar to that observed for the carbazole containing compounds. Nevertheless, the preferred benzylamine substitution pattern in the indole based compounds (predicted by our calculations) differs from the one predicted for the carbazole containing ligands. These latter compounds favour an *ortho* rather than *meta* substitution pattern for benzylamines. On the other hand perusal of Figure 12 suggests that the indole based compounds favours a *meta* over the *ortho* substitution, a substitution pattern also followed by the aniline bearing compounds. Moreover, for these latter compounds, the largest increase is observed for the hits containing a neutral ligand.

We have also studied the effect of the ligand protonation state on the number of hits. For the aniline as well as the benzylamine containing compounds (Figure 12), the number of hits increases (for the most part) when the amino group is protonated, rather than neutral.



4a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
4b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
4c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
5a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
5b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
5c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me





6a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
6b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
6c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
7a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
7b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
7c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me

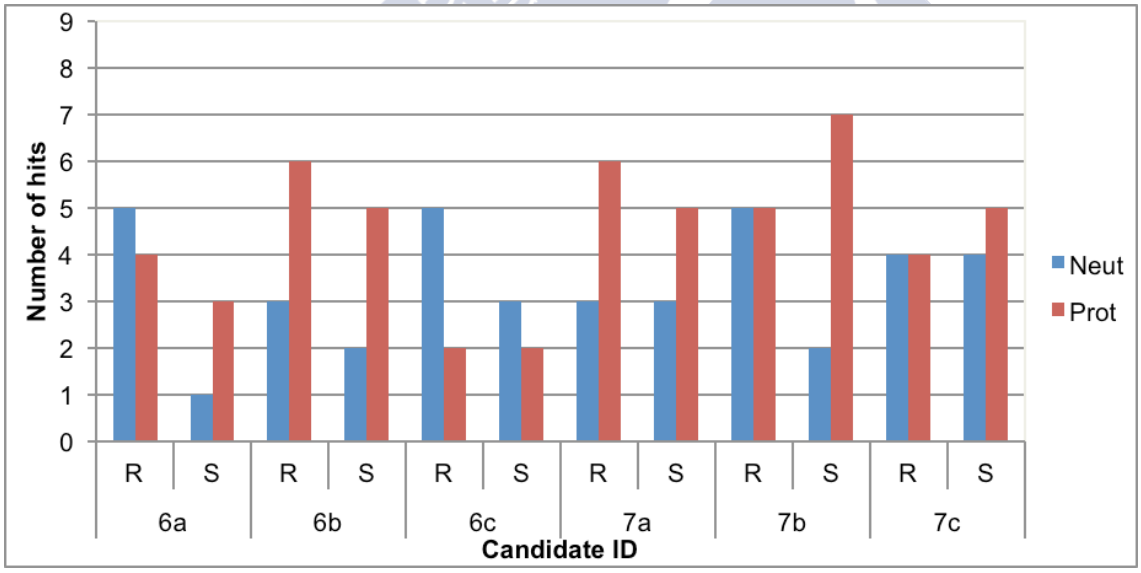


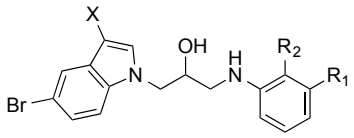
Figure 12. Global hit success that result from the docking to BACE-1 of indole derivatives, anilines (upper panel) and benzylamines (lower panel).

3.2.2 AChE ligand screening.

The global hit rate resulting from the AChE docking based screening calculations for the indole derivatives that contain a substituted aniline or benzylamine amine in *ortho* or *meta* positions are depicted in Figure 13. Comparison of the effect of the substitution pattern in both aniline and benzylamine (shown in this figure) indicate that changing the substitution from *ortho* to *meta* increases the number of hits. As seen from Figure 13, the number of hits obtained and the consensus reached across the three scoring functions indicate that our indolbenzylamine-containing compounds fit well inside AChE spanning both the main site (CAS) and the peripheral one (PAS). Moreover, comparison of the aniline bearing compounds with the benzylamine ones indicate that the latter present a larger number of hits across all scoring functions, probably due to an increase in size of the ligands that allow it to span better both binding sites.

One interesting issue are the docking exit poses. As we mentioned above in our pharmacophore depiction for AChE, we seek to have dual inhibitors in which one of the end aromatic fragments is to be found at the CAS and the other end aromatic group positions itself in the PAS, both producing π stacking interactions with the aromatic residue clusters residing in both sites (see Figure 1). There are two possible pose orientations that fulfil this hit. In the first one the indole moiety is predicted to be found in the CAS while the terminal benzyloxi group is to be found at the PAS. In the second possible pose, we have the inverse option in which the indole fragment resides at the PAS. We have listed in Figure 13 both poses and have referred to them as 'CAS' and 'PAS' respectively. As seen from these plots the number of 'CAS' hits (indole docked into CAS) is larger than the one that places this fragment in the PAS (both for aniline and benzylamine containing compounds), a result that we will try to verify through X-ray crystallography. In Figure 14 we depict the most favoured pose obtained for compound **7a** with the Chemscore fitness function. Notice that the indole fits neatly in the CAS, making π stacking interactions with residues W84 and F330, while the Bn group interacts with W279 and Y70 in the PAS.

Finally, our results (shown in Figure 13) indicate that there is scarcely a preference for one of the enatiomers, neither there is a clear proclivity for a neutral or charged state for the amino group.



4a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
4b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
4c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
5a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
5b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
5c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me

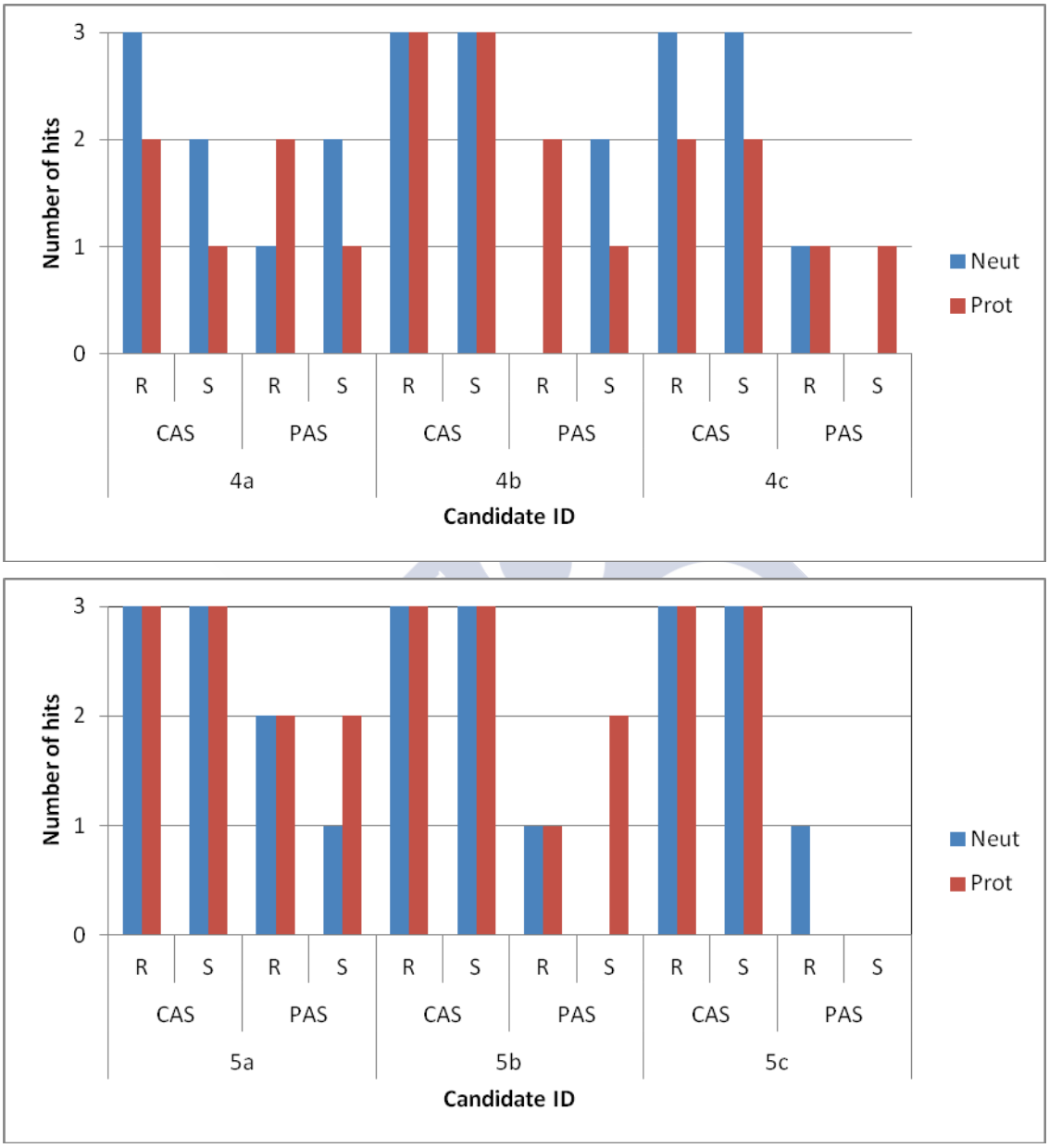
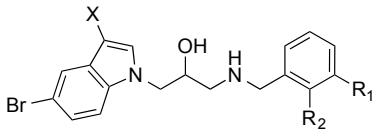


Figure 13a. Docking results of the indole bearing compounds with *ortho* (upper panel) and *meta* (lower panel) substituted anilines on AChE.



6a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
6b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
6c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
7a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
7b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
7c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me

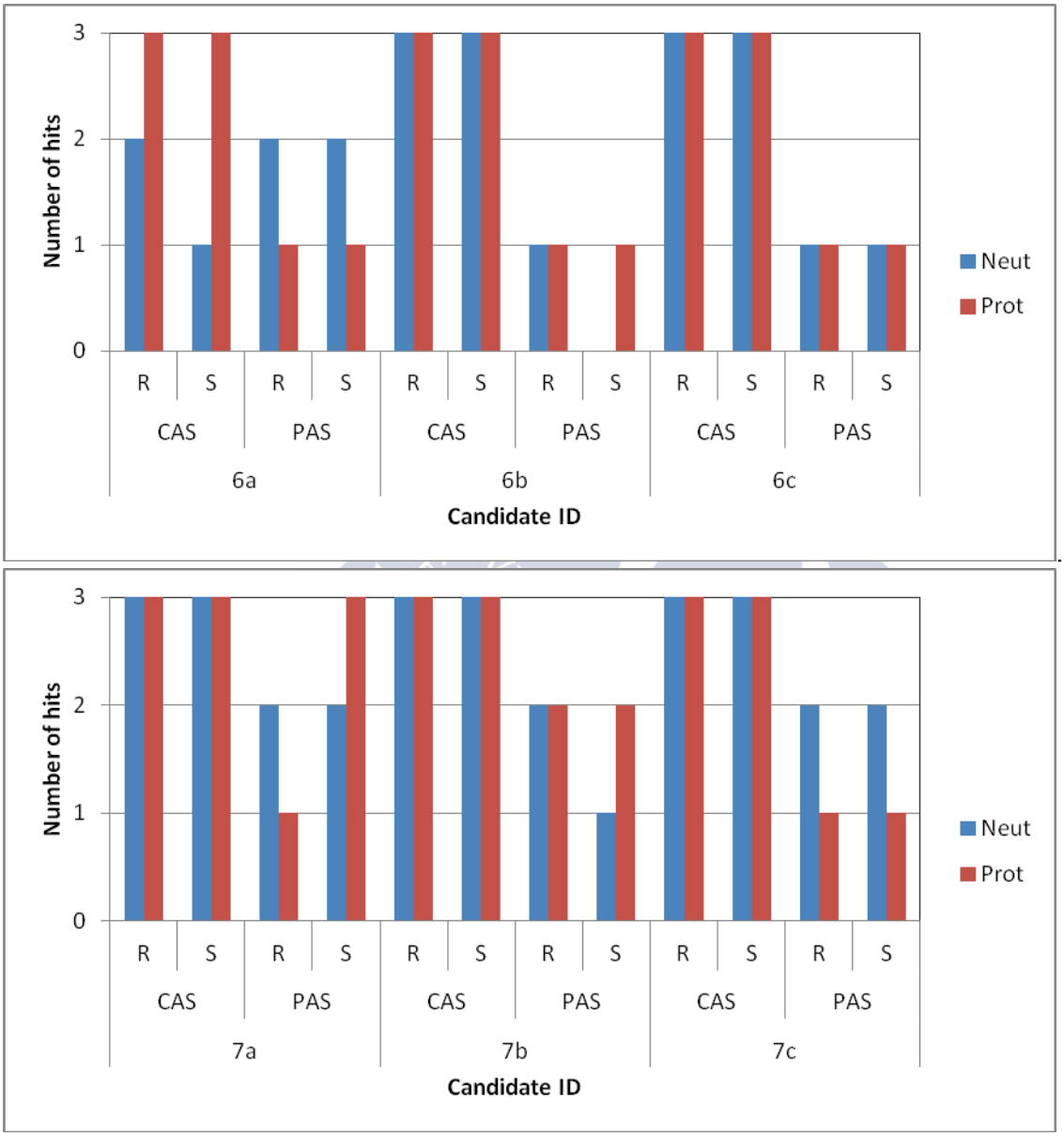


Figure 13b. Docking results for indole bearing compounds with *ortho* (upper panel) and *meta* (lower panel) substituted benzylamines on AChE.

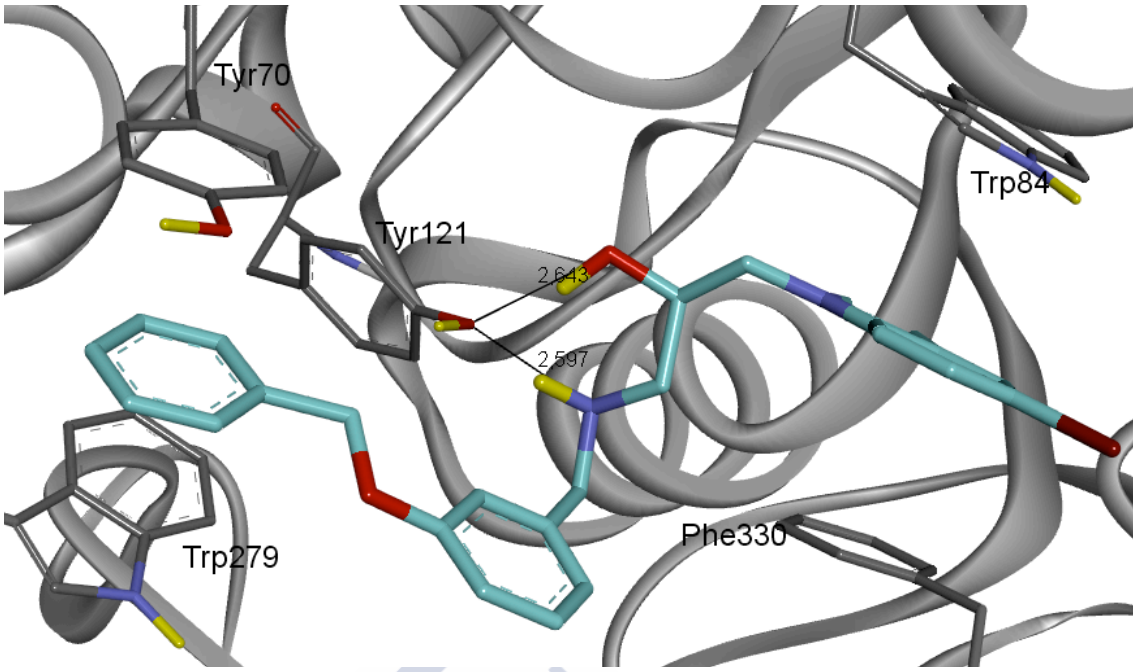


Figure 14. Pose for ligand **7a** in which the indole fragment interacts (through π stacking) with residues Trp 84 and Phe 330 in the CAS, while the treminal Bn group interacts with Tyr 70 and Trp 279 at the PAS site.

3.2.3. Inhibitor Aβ12-28 peptide interaction results.

We have performed the MD simulations on two of our indole candidates: one containing an aniline fragment (**4b**) and the other containing a benzylamine moiety (**7b**). The results indicate that fraction residency times around the peptide with 7.5 Å radii for these compounds are relatively high (0.88 and 0.96 respectively).

Figure 15 displays the ligands residency time around every residue of Aβ12-28. As seen from this figure, the ligands favour two binding spots (populated by aromatic residues), a result already observed for the carbazole containing compounds. The most frequented site is around the LVFFA segment, and the second one contains the two His residues at the start of the sequence. Another important feature is that these ligands present much higher residence times than the reference ligand, the 9,10-antraquinone, a compound that has a 30% fibril formation inhibition at 100 μM concentration. Furthermore, comparison of the intra-peptide residue interaction when these two ligands are present (see Figure 16) with the residue contact when they are absent (see Figure 11) indicates that these compounds clearly interrupt the formation of the hairpin structures that are the hallmark of Aβ peptide aggregates, indicating that these ligands may inhibit amyloid aggregation. Finally, we predict that the benzylamine-containing compound (**7b**)

reduces the formation of turns (around the DVSG segment) more efficiently than the aniline based compound (**4b**).

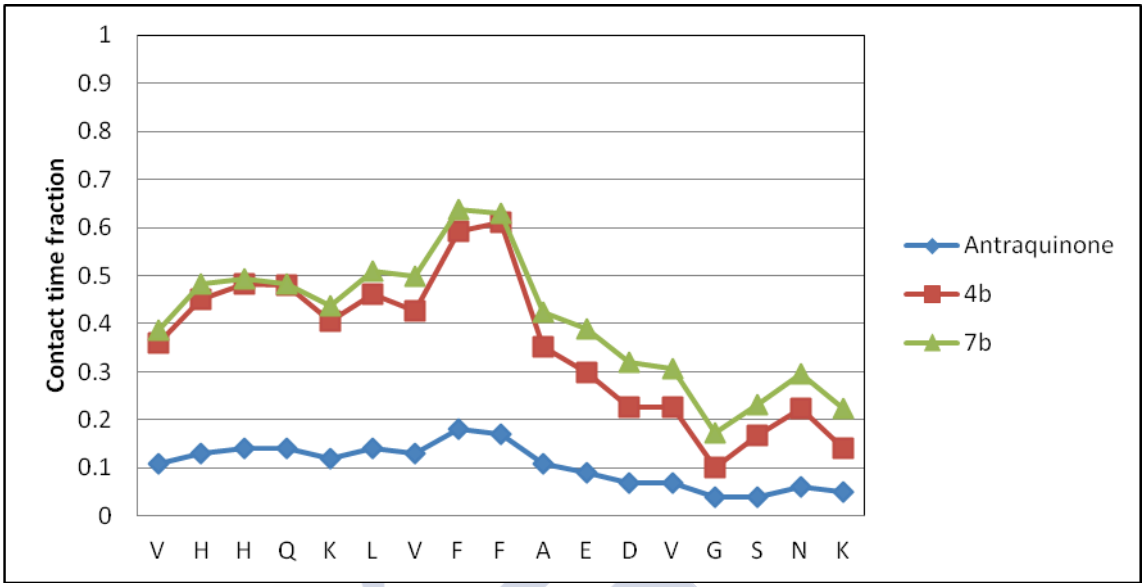


Figure 15. Ligand-peptide residues fraction contact times. Cut-off distance is set at 4.5 Å.

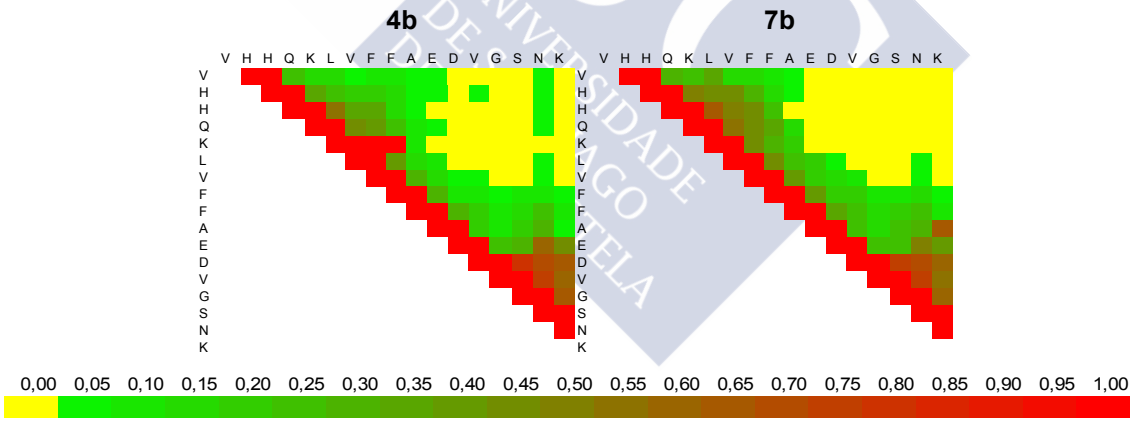
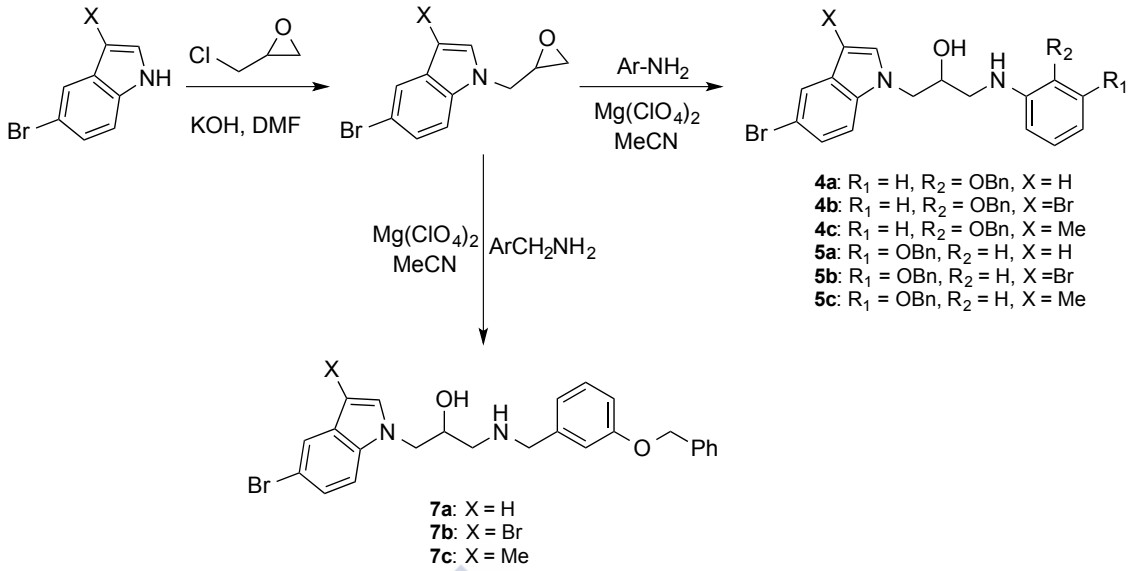


Figure 16. Residue-residue interaction contact map in the presence of the candidates **4b** and **7b**. The colour scale shown above indicates the residence times.

3.2.4. Synthesis and experimental inhibitory assays.

The indole derivatives whose structures contain either an aniline or a benzylamine fragment were obtained by the same synthetic route as the carbazole containing compounds indicated in Scheme 2, which includes the list of synthesized molecules.



Scheme 2. Synthetic route and indole derivatives synthesized.

The results of the binding assays to BACE-1, AChE, BuChE for the selected compounds, together with the fibril inhibition assay are listed in Table 3. As seen from this table the *meta* substituted benzylamine compounds display altogether much higher activity than the *ortho* substituted aniline ones for AChE, a result that validates the predictive power of our *in silico* protocol presented above. More importantly, the replacement of a carbazole by an indole moiety with a benzylamine substituted in *meta* has lead to candidates that bind **to all** amyloid cascade targets, (BACE-1, amyloid aggregates and the peripheral site in AChE), as well as to AChE's main site and BuChE, implying also a positive cholinergic effect in AD. Hence, compounds like **7c** are truly multitarget compounds.

Finally, the results displayed in Tables 2 and 3 also afford us with important structural information for the binding poses of both carbazole and indole bearing compounds to the cholinergic targets. For instance compounds **7a, 7b** and **7c** bind even better to BuChE than to AChE. This result has structural implications, since these two enzymes are highly homologous in the CAS, but BuChE replaces the targeted aromatic residues present in the PAS site of AChE by non-aromatic ones, precluding the formation of possible π stacking interactions in this enzyme.[34] Hence, the fact that there are ligands that bind to both cholinerases may mean that they are able to diffuse to the CAS site in AChE and bind to it. This experimental results support the idea that our design has produced dual AChE inhibitors that bind both to the CAS and the PAS of this enzyme, a

conclusion reached as well by the pose search in our docking based screening simulations (see Figures 13 and 14).

Table 3. Experimental results for indole based compounds.

Candidate	*Ee*AChE		hsBuChE		Aβ(1-40)		BACE-1	
	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 10μM	IC_{50}(μM)	%Inh.@ 100μM	IC_{50}(μM)	%Inh. @100μM	IC_{50}(μM)
4a	44 ± 1	--	17 ± 3	--	43 ± 1	--	5.7 ± 1.6	--
4b	45 ± 2	--	18 ± 3	--	23 ± 2	--	6.3 ± 1.4	--
4c	44 ± 1	--	19 ± 1	--	43 ± 5	--	16.4 ± 0.1	--
5a	--	8.5 ± 0.7	20 ± 2	--	55 ± 3	--	3.5 ± 2.4	--
5b	--	9.3 ± 0.6	24 ± 1	--	22 ± 2	--	1.8 ± 0.6	--
5c	--	12 ± 1	17 ± 1	--	57 ± 2	--	0.1 ± 0.1	--
7a	--	10.4 ± 0.1	--	0.70 ± 0.02	57 ± 3	--	--	3.0 ± 1.4
7b	--	9.1 ± 1.1	--	0.29 ± 0.05	47 ± 2	--	--	2.5 ± 0.1
7c	--	5.9 ± 1.0	--	0.39 ± 0.03	78 ± 1	34 ± 2	--	4.3 ±0 .8

4. DISCUSSION & CONCLUSIONS

As mentioned in the introduction, the search for single leads for all amyloid cascade targets represents a sizable challenge due to the substantial differences in their binding sites. To tackle this issue, we have proposed in this work a computer assisted route that relies on a pharmacophore whose scaffold was built on knowledge obtained in our lab and others. The search for compounds with the proposed scaffold led us to a group of carbazole containing compounds with substituted aniline fragments, which has been previously identified as neuro-protecting and neuro-generating compounds in mice.[8] In order to search for leads based on this scaffold we conceived a computer-assisted protocol that combines docking simulations (for the enzyme targets) with MD simulations that studied the time evolution of an amyloid peptide fragment in the presence of our candidates. The main novelty of the docking protocol is that the hit poses should comply with the set of inhibitor-protein interactions assigned to our pharmacophore (see Figure 1).

This work had a twofold aim. Firstly, to investigate if these compounds owed their biologic activity to their binding of some the amyloid cascade targets, and secondly to search for analogues with an increased affinity for the largest possible group of amyloid cascade targets. The first round of calculations to our original compounds displayed very few hits in BACE-1 (see Figure 5), but a number of hits in AChE. Our binding assays (Table 2) corroborated the outcome of our calculations, since the initial set of compounds displayed low affinities for BACE-1 (not surpassing the 33% BACE-1 inhibition at 1mM). Nevertheless, as predicted by our calculations these compounds

presented μM affinity for AChE for those compounds that present the largest scoring function values in our docking calculations (see results for **1e** and **1f** in Figure 7). Perusal of the exit docking poses indicates that these compounds are able to span both AChE binding sites, a result that could explain their better affinity as compared to their congeners. Finally, some of the compounds in the initial set display a fibril inhibition slightly above that of the reference compound 9-10 antraquinone.[33]

In order to improve the binding across the amyloid targets and especially for BACE-1, we proceeded to modify these compounds with the information afforded by two computer aided design cycles. The initial screening results for BACE-1 anticipated that most of the hits were obtained with the protonated amino group in the aniline (see Figure 5). In order to improve the probability that the amino group will actually be protonated we replaced the aniline moiety by a benzylamine fragment. The docking results predicted that the second generation compounds should improve their hit rates mainly for BACE-1. In order to test this outcome we synthesized and assayed two of the benzylamine containing compounds that showed promising results in the docking calculations (**3e** and **3f**). The binding assays indicated that the new candidates improved its binding affinity for BACE-1 by more than 3 orders of magnitude (IC_{50} =3.1 μM). Interestingly enough, these compounds also showed affinity for BuChE. In healthy brains, AChE hydrolyzes about 80% of acetylcholine while BuChE plays a secondary role. However, as AD progresses, the activity of AChE is greatly reduced in specific brain regions while BuChE activity increases, likely as a compensation for the AChE depletion. Consequently, both enzymes are useful therapeutic targets for AD[35] and our experimental results indicate that our compounds not only should affect the amyloid cascade at the core of the AD, but should have a positive cholinergic effect.

The design of the third generation ligands was afforded by the inspection of the exiting poses of the carbazole containing compounds, which showed that there was some steric clashes between the carbazole moiety and some of the residues belonging either to BACE-1 and AChE (see Figures S1 and S2). In order to avoid close van der Waals overlaps we designed a new set of ligands in which the carbazole moiety was replaced by indol, a smaller fragment, while at the other end we kept the substituted aniline or benzylamine fragments. Even in the case of the aniline containing compounds, the replacement of a carbazole for an indole (see Figures 5 and 12) increases substantially the number of hits for BACE-1, especially when the ligand is neutral. Moreover, we predict that an additional hit enrichment could be obtained by replacing the aniline

moiety by a benzylamine fragment substituted at *meta* rather than at *ortho* position (see Table S7 and Figure 12). Our docking calculations show that AChE has a very similar inhibitor preference as BACE-1, meaning that a consensus inhibitor design has been reached for both enzymes.

There has been a sizable effort in understanding the effect of ligands on the secondary structure of abeta peptides by MD simulations, in order to get some insight on the inhibitory effect of these ligands.[28] For instance, Wang et al.[36] studied the time evolution of the Aβ peptide in the presence of polyphenolic xantones. The analysis of rather short MD simulations (in the nanosecond regime) indicated that the presence of these ligands seem to help retain the alpha helix secondary structure (from which these simulations start) and hence preclude amyloid aggregation. On the other hand our results shed light on an open question that relates to the existence of an amyloidogenic core which serves as a template for amyloid oligomers and fibril formation, an issue that is relevant not only to AD but also to other pathologies (e.g., diabetes type 2 and Parkisnson's) that are associated with the misfolding of polypeptides.[37] Hence, a possible paradigm for an inhibition Abeta aggregation route could rely on precluding the emergence of the core structure with a beta hairpin structure. Comparison of the results obtained from our MD simulations of an Aβ fragment (residues 12 to 28) in the presence and absence of our candidate compounds seem to indicate that the best aggregation inhibitors are able to modulate the secondary structure of the peptide, partially precluding the formation of a hairpin aggregation template. Nevertheless, we expect that this simple protocol based on MD simulations of a single Abeta peptide fragment may not be able to give a quantitative inhibition ranking, but rather would enable us to tell apart the best binders.

The results of the enzyme FRET assays for BACE-1, AChE and BuChE, as well as ThT fibril formation assays on indole based compounds with an aniline and *meta* substituted benzylamine derivatives fully support the outcome of our calculations, indicating that the latter set of compounds (**7a**, **7b** and **7c**) are by far the most superior candidates, and display a multi-target behaviour across the amyloid cascade and cholinergic pathways.

Besides affording robust predictions about the relative affinity of our candidate compounds, our computer assisted protocol has provided us with valuable structural predictions such as the flap opening in BACE-1 when bound to our inhibitors, or the orientation of the ligands in AChE, issues we are trying to verify by X-ray crystallography.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to the Xunta de Galicia and Ministerio de Educación y Ciencia for financial support, the Center for Supercomputing in Galicia (CESGA) for computer time and to Prof. Amedeo Caflisch for hosting one of us (J.L.D.) for a short term visit that allowed him to become familiar with the computer simulation protocols used in the study of amyloid aggregation.

Supporting Information Available: Data of docking to BACE-1 and AChE, as described in the text. General materials and methods for syntheses and *in vitro* biological evaluation. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES

1. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 702-716.

2. Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron* **2004**, *44*, 181-193.

3. Selkoe, D. J. Preventing Alzheimer's Disease. *Science* **2012**, *337*, 1488-1492.

4. Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-β-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891.

5. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Capsoni, S.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Margotti, E.; Cattaneo, A.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. A Small Molecule Targeting the Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3689-3692.

6. Bolognesi, M. L.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 303-308.

7. Zhu, Y.; Xiao, K.; Ma, L.; Xiong, B.; Fu, Y.; Yu, H.; Wang, W.; Wang, X.; Hu, D.; Peng, H.; Li, J.; Gong, Q.; Chai, Q.; Tang, X.; Zhang, H.; Li, J.; Shen, J. Design, synthesis and biological evaluation of novel dual inhibitors of acetylcholinesterase and β-secretase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1600-1613.

8. McMillan, K. S.; Naidoo, J.; Liang, J.; Melito, L.; Williams, N. S.; Morlock, L.; Huntington, P. J.; Estill, S. J.; Longgood, J.; Becker, G. L.; McKnight, S. L.; Pieper, A. A.; De Brabander, J. K.; Ready, J. M. Development of Proneurogenic, Neuroprotective Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1428-1437.

9. Yuan, J.; Venkatraman, S.; Zheng, Y.; McKeever, B. M.; Dillard, L. W.; Sing, S. B. Structure-Based Design of *β*-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 4156–4180.

10. Domínguez, J. L.; Christopeit, T.; Villaverde, M. C.; Gossas, T.; Otero, J. M.; Nyström, S.; Baraznenok, V.; Lindström, E.; Danielson, U. H.; Sussman, F. Effect of the Protonation State of the Titratable Residues on the Inhibitor Affinity to BACE-1. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7255-7263.

11. Sussman, F.; Villaverde, M. C.; Domínguez, J. L.; Danielson, U. H. On the Active Site Protonation State in Aspartic Proteases: Implications for Drug Design. *Curr. Pharm. Design* **2013**, *19*, 4257-4275.

12. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. Acetvlcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10-22.

13. Hopkins, C. R. ACS Chemical Neuroscience Molecule Spotlight on Dimebon. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 587-588.

14. Yang, W.; Wong, Y.; Ng, O. T. W.; Bai, L.-P.; Kwong, D. W. J.; Ke, Y.; Jiang, Z.-H.; Li, H.-W.; Yung, K. K. L.; Wong, M. S. Inhibition of Beta-Amyloid Peptide Aggregation by Multifunctional Carbazole-Based Fluorophores. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1840-1846.

15. GOLD, version 5.1, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK.

16. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C. Molecular Recognition of Receptor Sites using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 43-53.

17. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748.

18. Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. Flexible Docking Using Tabu Search and an Empirical Estimate of Binding Affinity. *Proteins* **1998**, *33*, 367-382.

19. Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445.

20. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **2003**, *52*, 609-623.

21. Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. J. *Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84-96.

22. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 (β-Secretase) Complexed with Inhibitor. *Science* **2000**, *290*, 150-153.

23. Wang, Y.-S.; Strickland, C.; Voigt, J. H.; Kennedy, M. E.; Beyer, B. M., Senior, M. M., Smith, E. M., Nechuta, T. L.; Madison, V. S.; Czarniecki, M.; McKittrick, B. A.; Stamford, A. W.; Parker, E. M.; Hunter, J. C.; Greenlee, W. J.; Wyss, D. F. Application of Fragment-Based NMR Screening, X-ray Crystallography, Structure-Based Design, and Focused Chemical Library Design to Identify Novel μM Leads for the Development of nM BACE-1 (β-site APP Cleaving Enzyme 1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 942-950.

24. Patel, S.; Vuillard, L.; Cleasby, A.; Murray, C. W.; Yon, J. Apo and Inhibitor Complex Structures of BACE (β-secretase). *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 407-416.

25. Discovery Studio, versions 2.1 and 2.5. Accelrys Inc., San Diego, CA

26. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500.

27. a) Convertino, M.; Vitalis, A.; Caflisch, A. Disordered Binding of Small Molecules to Aβ(12-28). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 41578-41588. b) Scherzer-Attali, R.; Pellarin, R.; Convertino, M.; Frydman-Marom, A.; Egoz-Matia, N.; Peled, S.; Levy-Sakin, M.; Shalev, D. E.; Caflisch, A.; Gazit, E.; Segal, D. Complete Phenotypic Recovery of an Alzheimer's Disease Model by a Quinone-Tryptophan Hybrid Aggregation Inhibitor. PLoS ONE, **2010**, *5*, e11101. c) Scherzer-Attali, R.; Convertino, M.; Pellarin, R.; Gazit, E.; Segal, D.; Caflisch, A. Methylations of Tryptophan-Modified Aaphthoquinone Affect Its Inhibitory Potential toward Aβ Aggregation. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 1780-1789.

28. Lemkul, J. A.; Bevan, D. R. The Role of Molecular Simulations in the Development of Inhibitors of Amyloid β-Peptide Aggregation for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 845-856.

29. Lührs, T.; Ritter, C.; Adrian, M., Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Döbeli, H.; Schubert, D.; Riek, R. 3D structure of Alzheimer's amyloid-β(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17342-17347.

30. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.

31. Haberthür, U.; Caflisch, A. FACTS: Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 701-715.

32. Domínguez, J. L.; Villaverde, M. C.; Sussman, F. Effect of pH and ligand charge state on BACE-1 fragment docking performance. *J. Comput Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 403-417.

33. Convertino, M.; Pellarin, R.; Catto, M.; Carotti, A.; Caflisch, A. 9,10-Anthraquinone hinders β-aggregation: How does a small molecule interfere with Aβ-peptide amyloid fibrillation? *Protein Sci.* **2009**, *18*, 792-800.

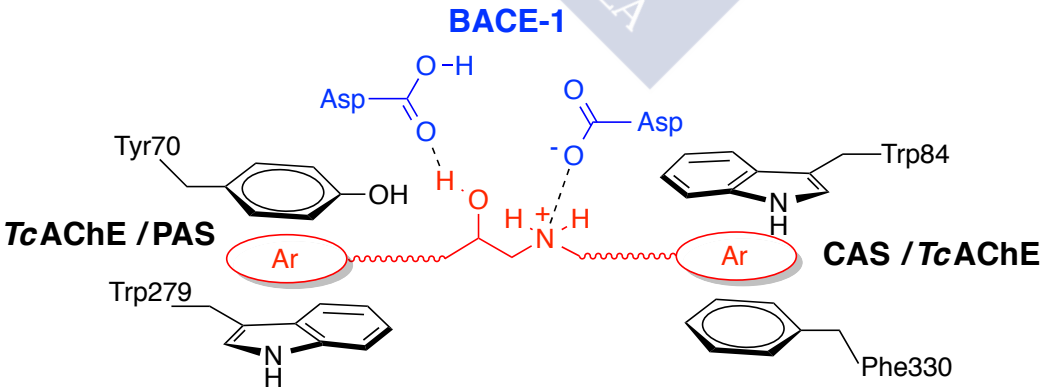
34. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141-41147.

35. Li, S.-Y.; Jiang, N.; Xie, S.-S.; Wang, K. D. G.; Wang, X.-B-; Kong, L.-Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-rhein hybrid as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem*. **2014**, *12*, 801-814.

36. Wang, Y.; Xia, Z.; Xu, J.-R.; Wang, Y.-X.; Hou, L.-N.; Qiu, Y.; Chen, H.-Z. α-Mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β-amyloid oligomers-induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 871-881.

37. Buchanan, L. E.; Dunkelberger, E. B.; Tran, H. Q.; Cheng, P.-N.; Chiu, C.-C.; Cao, P.; Raleigh, D. P.; de Pablo, J. J.; Nowick, J. S.; Zanni, M. T. Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient β-sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 19285-19290.

TOC graphic:



Supporting Information

Receptor Structure Based Design of Multitarget Leads for the Alzheimer's Disease Amyloid Cascade

José L. Domínguez,[1] Fernando Fernández-Nieto,[2] Marian Castro,[3] Marco Catto,[4] M. Rita Paleo,[1,2] Silvia Porto,[2] F. Javier Sardina,[2] José M. Brea,[3] Angelo Carotti,[4] M. Carmen Villaverde,[1]* and Fredy Sussman[1]*

[1]*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain*

[2]*Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain*

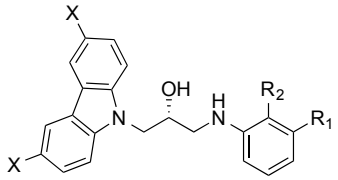
[3]*Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacia Industrial, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain*

[4]*Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", 70125-Bari, Italy*

TABLE OF CONTENTS:

Tables S1 to **S7**. Data of docking to BACE-1 and AChE	S2-S9
Figure S1. Snapshot of compound **1a** docked to BACE-1	S9
Figure S2. Snapshot of compound **3e** docked to AChE	S10
Experimental section	S10
Chemical Procedures	S10-S18
In Vitro BACE-1 enzyme assay	S18
AChE and BuChE inhibition assays	S19
Abeta aggregation and fibrillogenesis: ThT fluorescence assays	S20
References	S21-S22
^{1}H and ^{13}C NMR Spectra	S23–S39

Table S1. Docking results to BACE-1 with three different flap openings for carbazole derivatives **1a**-**1g** with an *ortho* or *meta*-substituted aniline in both, neutral and protonated states.[a]

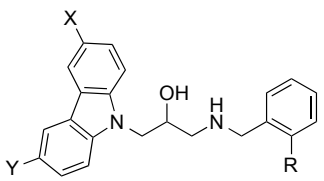


1a: X = H, R_1 = H, R_2 = OMe
1b: X = H, R_1 = H, R_2 = OBn
1c: X = H, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
1d: X = Br, R_1 = H, R_2 = OMe
1e: X = Br, R_1 = H, R_2 = OBn
1f: X = Br, R_1 = H, R_2 = OCH_2CH_2Ph
1g: X = Br, R_1 = OMe, R_2 = H

Candidate		ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
		Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
1a	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	37.2 (01)	--	--	--	--	--	--
1b	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	--	75.7 (01)	--	--	--	--	92.8 (02)
1c	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	46.4 (01)	--	--	--	--	--	90.4 (01)
1d	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	32.3 (01)	--	--	57.7 (02)	--	70.9 (01)	82.46 (01)	--	--
1e	Neut	--	--	--	68.08 (05)	65.06 (05)	73.15 (05)	--	--	--
	Prot	--	--	43.1 (03)	81.9 (01)	--	--	--	--	--
1f	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Prot	--	--	--	84.7 (01)	--	--	--	--	--
1g	Neut	28.50 (10)	--	--	--	58.16 (01)	--	--	--	--
	Prot	35.94 (01)	33.81 (01)	40.01 (01)	--	--	71.02 (03)	--	--	80.80 (02)

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S2. BACE-1 with three different flap openings docking results for carbazole derivatives **2a**-**2h** in their protonated state (protonated *ortho*-benzylamines).[a]

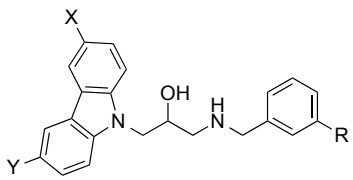


2a: X = Y = H, R = OMe
2b: X = Y = H, R = OBn
2c: X = Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
2d: X = Y = Br, R = OMe
2e: X = Y = Br, R = OBn
2f: X = Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
2g: X = Br, Y = Me, R = OBn
2h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidate		ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
		Open	Med	Closed[d]	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
2a	R	35.5 (01)	--	--	69.5 (01)	59.1 (01)	65.5 (03)	--	72.0 (02)	--
	S	30.86 (04)	31.72 (04)	--	--	57.83 (03)	--	67.60 (01)	--	--
2b	R	39.7 (01)	--	--	--	--	76.9 (01)	--	77.8 (02)	86.1 (01)
	S	--	37.66 (02)	34.51 (04)	63.73 (05)	76.09 (01)	--	--	--	--
2c	R	40.1 (01)	40.3 (02)	--	72.6 (03)	66.3 (01)	--	82.8 (01)	80.1 (02)	93.6 (01)
	S	37.58 (01)	32.80 (03)	--	60.20 (08)	60.39 (08)	--	78.84 (01)	--	--
2d	R	34.7 (01)	34.4 (01)	41.0 (03)	--	56.8 (02)	--	--	--	--
	S	33.86 (03)	35.53 (05)	--	--	70.42 (01)	78.39 (01)	--	72.40 (07)	--
2e	R	35.7 (03)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	32.95 (02)	32.85 (06)	--	63.15 (01)	56.92 (01)	66.58 (01)	68.49 (07)	--	--
2f	R	37.7 (01)	--	--	71.6 (01)	66.4 (01)	--	--	--	95.2 (01)
	S	39.94 (01)	38.95 (02)	--	65.74 (04)	--	68.89 (01)	--	--	--
2g	R	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	34.55 (01)	38.85 (01)	--	58.58 (10)	70.76 (03)	--	--	--	--
2h	R	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	--	36.21 (04)	--	68.41 (03)	--	--	--	--	--

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S3. Docking results in BACE-1 with three different flap openings for carbazole derivatives **3b**-**3h** with *meta*-substituted benzylamines in both, neutral and protonated states.[a]



3a: X = Y = H, R = OMe
3b: X = Y = H, R = OBn
3c: X = Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
3d: X = Y = Br, R = OMe
3e: X = Y = Br, R = OBn
3f: X = Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
3g: X = Br, Y = Me, R = OBn
3h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidate			ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
			Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
3a	R	Neut	34.1 (01)	34.8 (03)	--	58.5 (02)	52.9 (01)	54.8 (06)	--	--	--
	S	Neut	32.3 (08)	34.3 (06)	--	--	--	50.6 (09)	--	--	--
	R	Prot	33.7 (01)	--	--	--	--	60.8 (05)	--	--	76.7 (01)
	S	Prot	35.0 (01)	34.3 (02)	30.4 (02)	58.1 (03)	--	61.1 (04)	--	--	--
3b	R	Neut	--	--	29.93 (07)	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	36.91 (02)	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	--	--	--	76.0 (04)	--	--
	S	Prot	--	37.67 (07)	--	--	64.77 (01)	--	--	--	--
3c	R	Neut	34.94 (07)	--	--	68.48 (05)	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	61.95 (07)	--	--	--	--	--
	R	Prot	33.27 (07)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	35.32 (04)	42.22 (01)	--	70.96 (02)	--	--	--	--	--
3d	R	Neut	--	32.4 (04)	--	54.1 (10)	--	--	--	--	--
	S	Neut	33.8 (01)	33.2 (04)	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	29.9 (06)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	33.8 (02)	31.2 (02)	--	60.2 (01)	56.6 (10)	--	--	--	--
3e	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	36.54 (01)	--	--	70.85 (03)	--	--	--	--	--
	R	Prot	37.13 (02)	--	38.33 (01)	64.56 (06)	62.53 (07)	61.61 (07)	--	--	--
	S	Prot	--	38.1 (02)	--	--	72.67 (01)	--	--	--	--
3f	R	Neut	35.23 (04)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	61.86 (08)	--	--	--	--
	R	Prot	33.45 (08)	33.89 (07)	32.10 (07)	--	--	72.01 (04)	--	--	--
	S	Prot	37.32 (01)	--	--	--	--	--	--	--	--

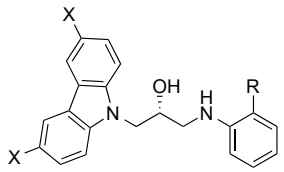
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table S3 (Cont).

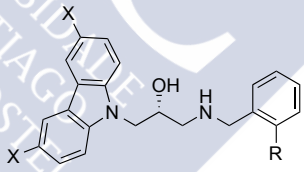
Candidate			ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
			Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
3g	R	Neut	38.17 (01)	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	65.74 (05)	--	--	--	--	--
	R	Prot	39.41 (01)	--	--	--	66.20 (03)	--	--	--	--
	S	Prot	--	--	39.86 (01/1)	--	--	--	--	--	--
3h	R	Neut	--	--	--	--	64.34 (10)	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	34.65 (05)	36.88 (02)	--	--	67.93 (02)	--	--	--	--

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S4. AChE docking results for carbazole derivatives **1a**-**1f** (*ortho*-anilines) and **2a**-**2f** (*ortho*-benzylamines) in their protonated state.[a]



1a: X = H, R = OMe
1b: X = H, R = OBn
1c: X = H, R = OCH_2CH_2Ph
1d: X = Br, R = OMe
1e: X = Br, R = OBn
1f : X = Br, R = OCH_2CH_2Ph



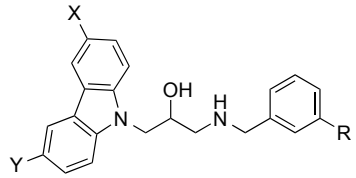
2a: X = H, R = OMe
2b: X = H, R = OBn
2c: X = H, R = OCH_2CH_2Ph
2d: X = Br, R = OMe
2e: X = Br, R = OBn
2f : X = Br, R = OCH_2CH_2Ph

Candidate	Chemscore	GoldScore	ChemPLP
1a	--	--	--
1b	63.2 (01)	--	137.5 (01)
1c	64.6 (01)	96.9 (01)	143.2 (01)
1d	--	--	--
1e	63.0 (02)	102.4 (03)	144.8 (01)
1f	67.6 (02)	97.8 (03)	147.7 (01)

Candidate	Chemscore	GoldScore	ChemPLP
2a	--	--	--
2b	65.6 (01)	97.8 (02)	141.5 (01)
2c	65.2 (01)	104.4 (01)	140.8 (01)
2d	--	--	--
2e	65.9 (01)	107.5 (02)	134.5 (01)
2f	69.9 (01)	113.3 (01)	145.8 (01)

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S5. AChE docking results for carbazole derivatives **3b**-**3h** (*meta*-benzylamines) in both, neutral and protonated states.[a]

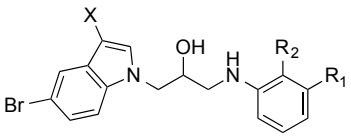


3b: X = Y = H, R = OBn
3c: X = Y = H, R = OCH_2CH_2Ph
3e: X = Y = Br, R = OBn
3f: X = Y = Br, R = OCH_2CH_2Ph
3g: X = Br, Y = Me, R = OBn
3h: X = Br, Y = Me, R = OCH_2CH_2Ph

Candidate			ChemScore	GoldScore	ChemPLP
3b	R	Neut	62.56 (01)	101.87 (01)	126.03 (02)
	S	Neut	61.16 (01)	105.07 (01)	134.79 (01)
	R	Prot	61.47 (01)	101.40 (04)	131.42 (03)
	S	Prot	64.75 (01)	104.23 (02)	132.19 (02)
3c	R	Neut	64.13 (01)	--	137.64 (01)
	S	Neut	61.47 (04)	97.98 (02)	136.59 (01)
	R	Prot	62.71 (01)	104.14 (02)	139.65 (01)
	S	Prot	61.92 (01)	92.44 (10)	137.09 (01)
3e	R	Neut	63.74 (02)	110.17 (01)	132.5 (01)
	S	Neut	64.74 (01)	106.44 (01)	129.99 (01)
	R	Prot	64.89 (01)	116.90 (02)	140.05 (01)
	S	Prot	63.67 (01)	107.86 (02)	131.31 (02)
3f	R	Neut	66.54 (01)	95.10 (09)	128.63 (04)
	S	Neut	64.58 (01)	--	135.90 (01)
	R	Prot	68.12 (01)	104.59 (02)	135.23 (01)
	S	Prot	65.90 (01)	108.56 (01)	135.76 (01)
3g	R	Neut	67.66 (01)	109.77 (03)	137.6 (02)
	S	Neut	65.98 (01)	101.28 (06)	135.84 (01)
	R	Prot	63.79 (03)	111.76 (02)	132.86 (02)
	S	Prot	65.39 (01)	97.61 (06)	131.29 (03)
3h	R	Neut	68.01 (01)	105.89 (01)	137.51 (01)
	S	Neut	68.21 (01)	105.08 (01)	133.63 (01)
	R	Prot	68.24 (01)	101.00 (01)	142.56 (01)
	S	Prot	66.77 (01)	105.64 (01)	137.83 (01)

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S6. Docking results in BACE-1 with three different flap openings for indole derivatives **4a**-**4c** (*ortho*) and **5a**-**4c** (*meta*) substituted anilines in both, neutral and protonated states.[a]

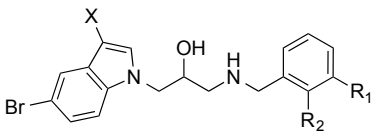


4a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
4b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
4c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
5a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
5b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
5c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me

Candidate			ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
			Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
4a	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	60.59 (01)	--	--	--	--
	R	Prot	--	--	--	60.84 (08)	61.05 (02)	--	--	77.9 (02)	--
	S	Prot	30.11 (10)	33.43 (02)	30.85 (02)	63.56 (02)	59.17 (09)	--	--	--	--
4b	R	Neut	--	--	--	57.92 (09)	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	30.51 (10)	--	--	64.78 (04)	--	--	--	71.62 (02)	--
	S	Prot	33.9 (01)	34.71 (03)	33.34 (03)	62.32 (07)	--	62.54 (02)	--	75.88 (03)	--
4c	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	R	Prot	31.27 (09)	--	--	60.00 (07)	56.90 (10)	--	--	74.21 (03)	--
	S	Prot	--	--	--	--	66.46 (02)	--	--	--	--
5a	R	Neut	--	--	--	--	--	--	--	74.79 (02)	--
	S	Neut	32.61 (01)	38.33 (01)	--	61.87 (04)	61.12 (01)	53.76 (07)	--	--	--
	R	Prot	32.18 (01)	34.11 (05)	--	--	--	--	--	71.66 (05)	--
	S	Prot	32.81 (01)	36.09 (03)	--	64.82 (04)	--	--	--	76.73 (03)	--
5b	R	Neut	34.24 (01)	33.78 (06)	31.30 (02)	70.36 (01)	57.00 (04)	--	--	--	--
	S	Neut	31.38 (04)	34.25 (07)	36.86 (01)	--	--	--	66.46 (10)	--	--
	R	Prot	32.08 (02)	33.84 (07)	--	58.13 (08)	--	--	67.90 (10)	--	--
	S	Prot	33.59 (01)	34.89 (07)	38.47 (01)	70.02 (01)	--	61.82 (07)	--	--	--
5c	R	Neut	--	35.76 (05)	--	63.72 (03)	61.00 (02)	--	--	69.75 (09)	--
	S	Neut	31.07 (05)	38.00 (02)	--	--	58.47 (03)	--	--	71.98 (05)	--
	R	Prot	31.17 (04)	36.23 (02)	29.48 (10)	63.58 (05)	59.36 (09)	--	--	--	--
	S	Prot	34.60 (01)	36.08 (02)	--	--	--	--	--	--	--

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

Table S7. Docking results in BACE-1 with three different flap openings for indole derivatives **6a**-**6c** (*ortho*) and **7a**-**7c** (*meta*) substituted benzylamines in both, neutral and protonated states.[a]



6a: R_1 = H, R_2 = OBn, X = H
6b: R_1 = H, R_2 = OBn, X =Br
6c: R_1 = H, R_2 = OBn, X = Me
7a: R_1 = OBn, R_2 = H, X = H
7b: R_1 = OBn, R_2 = H, X =Br
7c: R_1 = OBn, R_2 = H, X = Me

Candidate			ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
			Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
6a	R	Neut	35.40 (02)	35.10 (04)	--	62.21 (03)	64.69 (01)	--	--	74.42 (03)	--
	S	Neut	--	--	--	--	--	--	--	74.44 (02)	--
	R	Prot	33.53 (02)	35.32 (02)	--	66.93 (03)	--	--	--	74.19 (05)	--
	S	Prot	33.04 (03)	35.34 (02)	--	--	62.97 (08)	--	--	--	--
6b	R	Neut	35.41 (01)	36.50 (02)	--	56.78 (08)	--	--	--	--	--
	S	Neut	33.86 (01)	--	--	55.01 (10)	--	--	--	--	--
	R	Prot	37.67 (01)	37.27 (02)	--	60.84 (10)	63.97 (02)	56.28 (10)	--	72.22 (05)	--
	S	Prot	32.13 (02)	35.10 (04)	--	62.46 (03)	61.69 (08)	68.65 (01)	--	--	--
6c	R	Neut	33.99 (03)	36.29 (03)	--	62.31 (07)	59.32 (05)	--	--	74.31 (03)	--
	S	Neut	33.94 (04)	37.21 (03)	--	62.65 (04)	--	--	--	--	--
	R	Prot	34.05 (01)	35.22 (04)	--	--	--	--	--	--	--
	S	Prot	--	35.84 (03)	--	--	--	54.76 (09)	--	--	--
7a	R	Neut	36.08 (01)	37.96 (01)	--	--	--	--	74.27 (01)	--	--
	S	Neut	37.62 (01)	36.86 (02)	--	67.83 (03)	--	--	--	--	--
	R	Prot	33.38 (02)	37.82 (01)	--	--	63.97 (02)	61.31 (04)	71.73 (07)	83.70 (01)	--
	S	Prot	31.25 (10)	35.91 (02)	--	--	59.88 (04)	59.24 (08)	80.24 (01)	--	--
7b	R	Neut	38.27 (01)	35.74 (02)	31.11 (05)	64.54 (05)	--	--	70.36 (02)	--	--
	S	Neut	34.34 (02)	--	--	--	--	--	--	70.03 (03)	--
	R	Prot	--	33.66 (05)	29.07 (07)	67.87 (04)	59.89 (07)	59.86 (07)	--	--	--
	S	Prot	33.25 (04)	38.02 (01)	36.17 (02)	69.31 (01)	63.34 (02)	--	76.56 (01)	75.98 (02)	--

Table S7 (Cont.)

Candidate			ChemScore			GoldScore			ChemPLP		
			Open	Med	Closed	Open	Med	Closed	Open	Med	Closed
7c	R	Neut	34.00 (04)	35.69 (04)	--	67.07 (03)	--	--	74.20 (01)	--	--
	S	Neut	35.92 (01)	37.00 (01)	--	--	--	54.68 (07)	--	70.08 (08)	--
	R	Prot	38.00 (01)	37.85 (01)	--	64.84 (06)	--	--	--	70.07 (06)	--
	S	Prot	34.24 (02)	37.36 (02)	--	--	62.17 (08)	57.45 (09)	--	72.08 (07)	--

[a] The table shows scoring data for the ligand hit poses. Numbers in parentheses indicate the ranking position of the first hit pose.

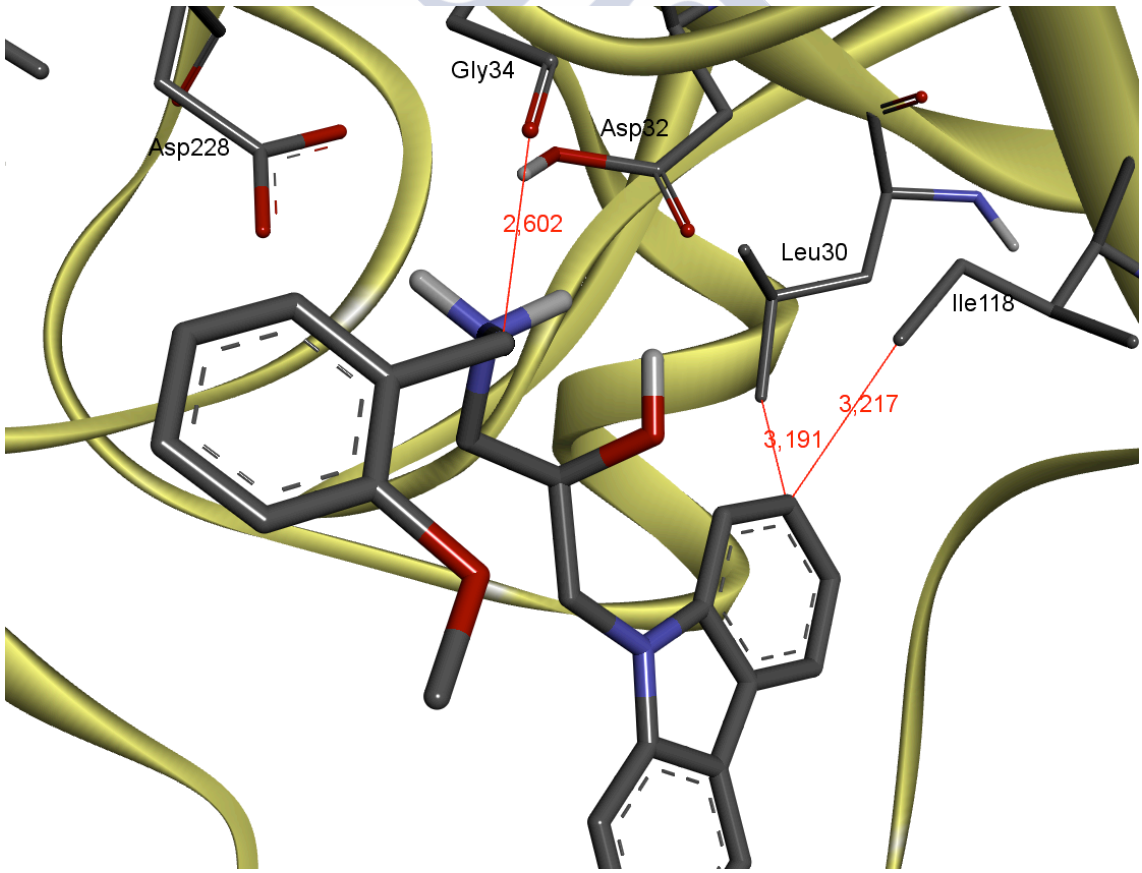


Figure S1. Snapshot of compound **1a** docked to BACE-1 with open flap using ChemScore scoring function. Notice the steric clashes between the side chains of Leu30 and Ile118 with the carbazole moiety of the ligand.

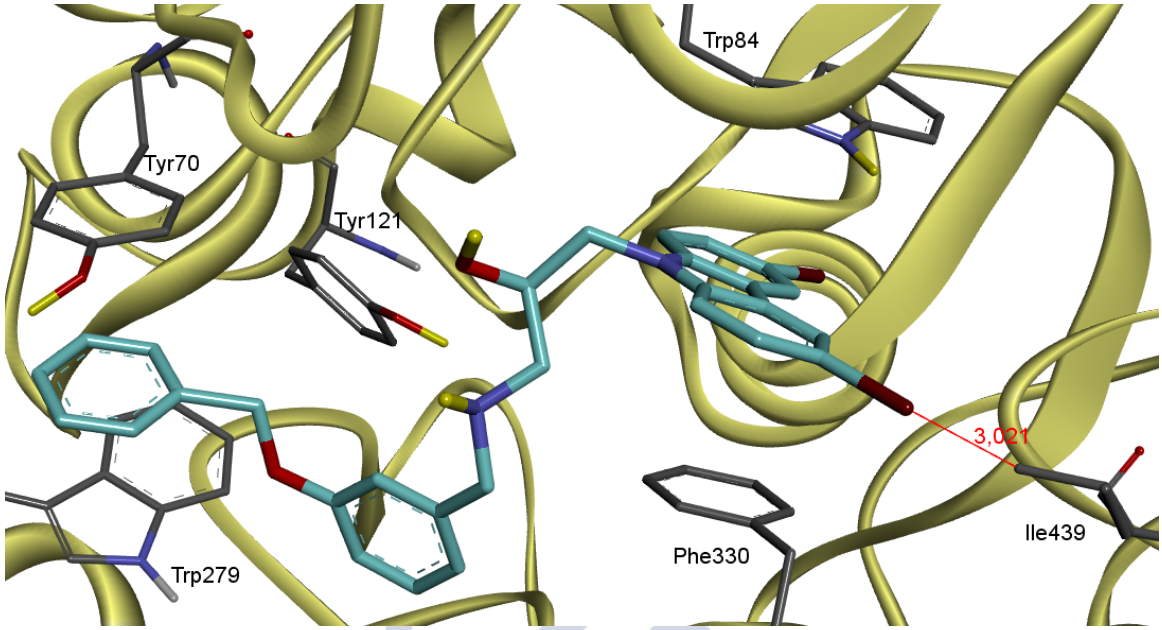
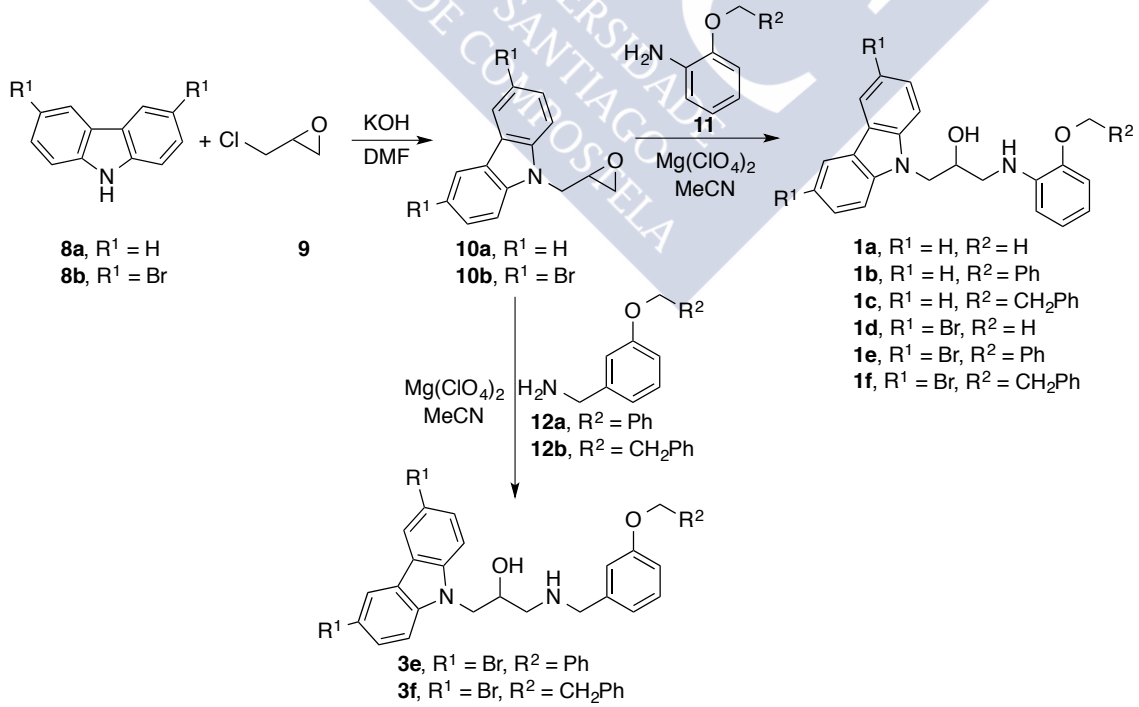
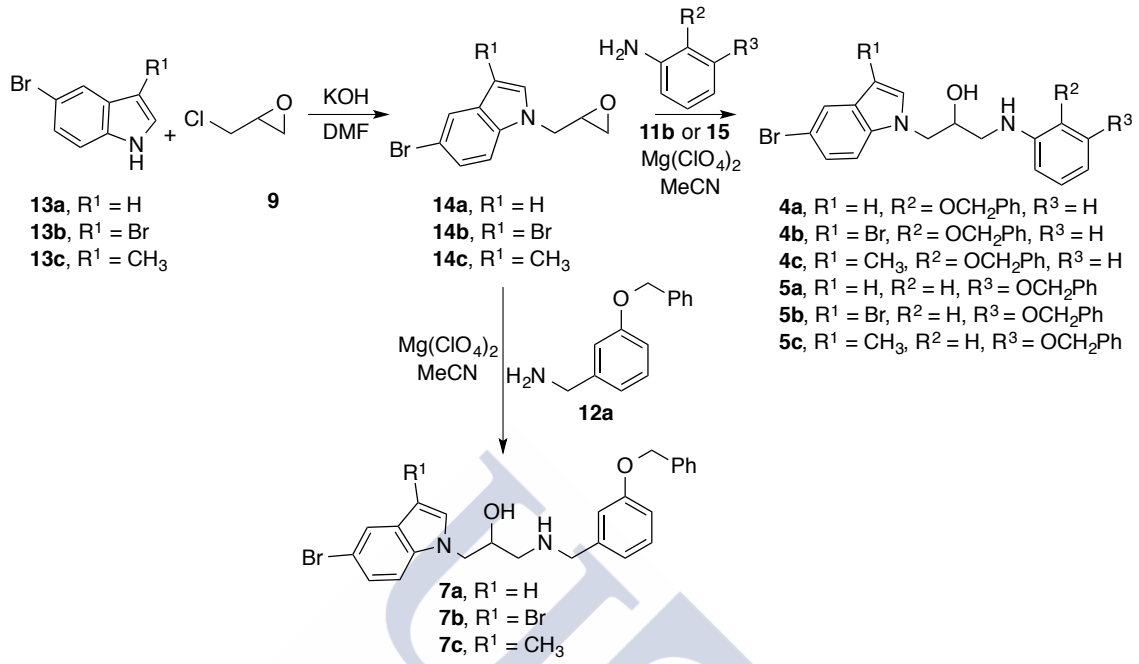


Figure S2. Snapshot of compound **3e** docked to AChE using ChemPLP scoring function. Notice the steric clashes between the side chain of Ile439 with the carbazole moiety of the ligand.

EXPERIMENTAL SECTION



Scheme S1. Synthesis of carbazole derivatives **1a-1f**, **3e** and **3f**.



Scheme S2. Synthesis of indole derivatives **4a**-**4c**, **5a**-**5c** and **7a**-**7c**.

General Procedures. All reactions requiring anhydrous conditions were conducted in flame-dried glassware under an atmosphere of dry argon. Solvents were distilled immediately before use: THF from Na/benzophenone, CH_2Cl_2 and CH_3CN from CaH_2. All commercially available reagents were purchased and used without further purification. 3,5-Dibromoindole[1] (**13b**), 2-phenethoxyaniline[2] (**11c**), carbazole-epoxide[3] **10** and indole-epoxide[3] **14** have been prepared according to known procedures. Silica gel 60 F254 plates (Merck) were used for Thin Layer Chromatography. Flash chromatography was performed on Merck 230−400 mesh silica gel 60. NMR spectra were recorded at room temperature on Varian Mercury 300 and Varian Inova 500 spectrometers. High-resolution mass spectrometry (HRMS) was carried out on a Bruker Microtof mass spectrometer. Elemental analyses were recorded on a Fisions EA1108 analyzer.

3-Benzyloxybenzylamine (**12a**). Methanesulfonyl chloride (0.4 mL, 5.15 mmol) was slowly added to a stirred solution of 3-benzyloxybenzyl alcohol (1.0 g, 4.67 mmol) and triethylamine (0.78 mL, 5.6 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C. After stirring at 0 °C for 1 h, aqueous 1 N HCl (6 mL) was added, and the organic layer was separated, washed with water (10 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and

concentrated to dryness. The residue was dissolved in DMF (15 mL) and potassium phthalimide (908 mg, 4.9 mmol) was added and the mixture stirred at rt for 12 h. The reaction mixture was partitioned between water (30 mL) and EtOAc (20 mL), and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The crude residue was dissolved in EtOH (28 mL), treated with hydrazine monohydrate (2 mL) and refluxed for 2h. After cooling down to rt, the mixture was filtered through Celite, evaporated and purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH 9:1) to afford **12a**[4] (0.810 g, 81%). ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.48-7.37 (m, 4H), 7.35 (m, 1H), 7.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 6.92 (ddq, *J* = 7.6, 1.6, 0.8 Hz, 1H), 6.85 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.82 (s, 2H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.5, 146.2, 137.8, 129.9, 129.0, 128.4, 128.1, 120.1, 114.0, 113.3, 70.4, 46.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{14}H_{16}NO$ $[M + H]^+$ 214.1226; found 214.1222.

3-Phenethoxybenzylamine (**12b**). A solution of 3-hydroxybenzyl alcohol (1.5 g, 12.1 mmol) in dry acetone (40 mL) was treated with anhydrous K_2CO_3 (4 g, 29 mmol) and 2-phenylethyl bromide (3.3 mL, 24.2 mmol). The mixture was heated at reflux with vigorous stirring for 12 h, cooled to rt, and additional 2-phenylethyl bromide (3.3 mL, 24.2 mmol) was added and the mixture was refluxed for another 12 h. The reaction was cooled to rt, filtered and concentrated to dryness. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, EtOAc/Hexane 1:5) to afford the desired compound (2.01 g, 73%). 3-Phenethoxybenzyl alcohol was then transformed into 3-phenethoxybenzylamine (76% yield) following the same procedure as for **12a**. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.36-7.30 (m, 4H), 7.25 (m, 2H), 6.89 (m, 2H), 6.78 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.6, 146.1, 139.1, 129.9, 129.5, 128.9, 126.9, 119.9, 113.7, 113.1, 69.1, 46.9, 36.3. HRMS (ESI): calcd. for $C_{15}H_{18}NO$ $[M + H]^+$ 228.1383; found 228.1389.

General procedure for the synthesis of carbazole derivatives 1–3 and indole derivatives 4–7. A stirred solution of the corresponding carbazole-epoxide[3] **10** (3.5 mmol) in freshly distilled CH_3CN (18 mL) at rt was treated with aniline **11** (3.85 mmol) and $Mg(ClO_4)_2$ (3.85 mmol).[5] The reaction mixture was then heated at 40 ºC under argon for 24 h. The solvent was evaporated, and the residue was partitioned between EtOAc (20 mL)

and water (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography (SiO_2, EtOAc-hexane, 1:5 to 1:1).

1-(9*H*-Carbazol-9-yl)-3-((2-methoxyphenyl)amino)propan-2-ol (1a). Starting from carbazole-epoxide **10a** and 2-methoxyaniline (**11a**), compound **1a** was isolated as a greyish-white solid in 72% yield; mp 116–117 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.13 (ddd, *J* = 7.8, 1.3, 0.7 Hz, 2H), 7.61 (dt, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 2H), 7.41 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 1.2 Hz, 2H), 7.20 (ddd, *J* = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, 2H), 6.82 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.74 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.59 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.54 (m, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.39 (dd, *J* = 12.7, 3.9 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 12.7, 6.3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 148.0, 141.8, 139.2, 126.4, 123.6, 121.9, 120.8, 119.7, 117.2, 110.8, 110.4, 110.3, 69.6, 55.8, 48.1. HRMS (ESI): calcd. for $C_{22}H_{23}N_2O_2$ [M + H]$^+$ 347.1754; found 347.1760. Anal. Calcd for $C_{22}H_{22}N_2O_2$: C, 76.28; H, 6.40; N, 8.09. Found: C, 76.05; H, 6.37; N, 7.99.

1-((2-Benzyloxyphenyl)amino)-3-(9*H*-carbazol-9-yl)propan-2-ol (1b). Starting from carbazole-epoxide **10a** and 2-benzyloxyaniline (**11b**), compound **1b** was isolated as a white solid in 68% yield; mp 129 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.12 (ddd, *J* = 7.8, 1.2, 0.7 Hz, 2H), 7.60 (dt, *J* = 8.3, 0.8 Hz, 2H), 7.52 (ddt, *J* = 7.3, 1.4, 0.7 Hz, 2H), 7.38 (m, 5H), 7.19 (ddd, *J* = 7.8, 7.1, 1.0 Hz, 2H), 6.93 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 6.77 (m, 1H), 6.58 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.06 (br s, 1H), 4.54 (m, 4H), 3.42 (dd, *J* = 12.7, 4.1 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 12.7, 6.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 147.1, 141.9, 139.7, 138.6, 129.3, 128.6, 128.3, 126.4, 123.6, 122.4, 120.8, 119.7, 117.2, 112.4, 111.1, 110.3, 70.9, 69.6, 48.14, 48.11. HRMS (ESI): calcd. for $C_{28}H_{27}N_2O_2$ [M + H]$^+$ 423.2067; found 423.2060.

1-(9*H*-Carbazol-9-yl)-3-((2-phenethoxyphenyl)amino)propan-2-ol (1c). Following the general procedure, compound **1c** was prepared from carbazole-epoxide **10a** and 2-phenetoxyaniline (**11c**), and isolated as an oil in 60% yield. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.13 (dt, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 2H), 7.60 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 2H), 7.40 (m, 4H), 7.21 (m, 5H), 6.84 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 6.74 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.55 (ddd, *J* = 16.6, 7.7, 1.6 Hz, 2H), 4.90 (br s, 1H), 4.51 (m, 4H), 4.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.35 (dd, *J* =

12.6, 4.2 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 12.6, 6.1 Hz, 1H), 3.11 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 147.1, 141.8, 139.6, 139.4, 129.9, 129.1, 127.0, 126.4, 123.6, 122.1, 120.8, 119.7, 117.2, 111.7, 110.9, 110.3, 69.7, 69.6, 48.0, 36.5. HRMS (ESI): calcd. for $C_{29}H_{29}N_2O_2$ $[M + H]^+$ 437.2224; found 437.2224.

1-(3,6-Dibromo-9*H*-carbazol-9-yl)-3-((2-methoxyphenyl)amino)propan-2-ol (1d). According to the general procedure, compound **1d** was prepared from carbazole-epoxide **10b** and 2-methoxyaniline (**11a**), and isolated as a light brown solid in 80% yield; mp 140 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.37 (dd, *J* = 1.9, 0.6 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 8.7, 0.6 Hz, 2H), 7.55 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 2H), 6.83 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 6.76 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.59 (m, 2H), 4.89 (br s, 1H), 4.67-4.36 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.42 (dd, *J* = 12.7, 4.5 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 12.7, 6.4 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 148.0, 140.9, 139.2, 129.6, 124.3, 123.9, 122.0, 117.3, 112.6, 112.5, 110.8, 110.5, 69.6, 55.8, 48.4, 48.1. HRMS (ESI): calcd. for $C_{22}H_{21}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 502.9964; found 502.9972. Anal. Calcd for $C_{22}H_{20}Br_2N_2O_2$: C, 52.41; H, 4.00; N, 5.56. Found: C, 52.50; H, 4.13; N, 5.38.

1-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(3,6-dibromo-9*H*-carbazol-9-yl)propan-2-ol (1e). According to the general procedure, compound **1e** was prepared from carbazole-epoxide **10b** and 2-benzyloxyaniline (**11b**) as a white solid (74% yield); mp 155-156 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.54 (m, 6H), 7.36 (m, 3H), 6.94 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 6.79 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.61 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.02 (br s, 1H), 4.65-4.37 (m, 4H), 3.45 (dd, *J* = 12.8, 4.5 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 12.8, 6.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 147.1, 141.0, 139.6, 138.5, 129.6, 129.3, 128.6, 128.3, 124.3, 123.9, 122.4, 117.3, 112.6, 112.5, 112.4, 111.1, 70.9, 69.6, 48.3, 48.0. HRMS (ESI): calcd. for $C_{28}H_{25}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 579.0277; found 579.0270. Anal. Calcd for $C_{28}H_{24}Br_2N_2O_2$: C, 57.95; H, 4.17; N, 4.83. Found: C, 57.70; H, 4.14; N, 4.75.

1-(3,6-Dibromo-9*H*-carbazol-9-yl)-3-((2-phenethoxyphenyl)amino)propan-2-ol (1f). According to the general procedure, compound **1f** was prepared from carbazole-epoxide **10b** and 2-phenetoxyaniline (**11c**) as a greyish-white solid (65% yield); mp 160 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ: 8.37 (dd, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 2H), 7.55 (m, 4H), 7.36 (m, 2H), 7.25 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.58 (m, 2H), 4.85 (br s, 1H), 4.62-4.32 (m, 4H), 4.24 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.36 (dd, *J* = 12.6, 4.5 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 12.7, 6.1 Hz, 1H), 3.11 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75.45 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ:

147.1, 141.0, 139.8, 139.4, 129.9, 129.7, 129.2, 127.1, 124.4, 123.9, 122.1, 117.3, 112.6, 112.5, 111.8, 111.0, 69.8, 69.6, 48.4, 48.0, 36.5. HRMS (ESI): calcd. for $C_{29}H_{27}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 593.0434; found 593.0433. Anal. Calcd for $C_{29}H_{26}Br_2N_2O_2$: C, 58.60; H, 4.41; N, 4.71. Found: C, 58.40; H, 4.53; N, 4.62.

1-((3-(Benzyloxy)benzyl)amino)-3-(3,6-dibromo-9*H*-carbazol-9-yl)propan-2-ol (3e). According to the general procedure, compound **3e** was prepared from carbazole-epoxide **10b** and 3-benzyloxybenzylamine (**12a**), and isolated as a white foam in 75% yield after column chromatography (CH_2Cl_2-MeOH, 19:1 to 9:1). ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.54 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 2H), 7.46-7.29 (m, 7H), 7.22 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.87 (m, 3H), 5.04 (s, 2H), 4.30 (dd, *J* = 15.2, 4.6 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 15.1, 6.5 Hz, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.71 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 12.1, 8.4 Hz, 1H), 2.32 (br s, 2H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.5, 141.9, 140.6, 137.7, 130.1, 129.6, 129.1, 128.5, 128.1, 124.0, 123.6, 121.2, 115.2, 113.9, 112.7, 111.8, 70.4, 69.5, 53.95, 52.7, 47.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{29}H_{27}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 593.0434; found 593.0440. Anal. Calcd for $C_{29}H_{26}Br_2N_2O_2$: C, 58.60; H, 4.41; N, 4.71. Found: C, 58.78; H, 4.42; N, 4.51.

1-(3,6-dibromo-9*H*-carbazol-9-yl)-3-((3-phenethoxybenzyl)amino)propan-2-ol (3f). According to the general procedure, starting from carbazole-epoxide **10b** and 3-phenethoxybenzylamine (**12b**), compound **3f** was isolated in 70% yield as a white solid after column chromatography (CH_2Cl_2-MeOH, 19:1 to 9:1); mp 140–141 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 8.14 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.54 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (m, 4H), 7.22 (m, 2H), 6.80 (m, 3H), 4.32 (dd, *J* = 15.2, 4.6 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 15.2, 6.5 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.06 (ddt, *J* = 8.3, 6.5, 4.3 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.08 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.79 (dd, *J* = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 12.1, 8.4 Hz, 1H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.6, 142.3, 140.6, 139.1, 130.0, 129.6, 129.5, 129.0, 127.0, 124.0, 123.5, 120.9, 114.8, 113.5, 112.6, 111.9, 69.6, 69.2, 54.1, 52.7, 47.9, 36.2. HRMS (ESI): calcd. for $C_{30}H_{29}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 607.0590; found 607.0594. Anal. Calcd for $C_{30}H_{28}Br_2N_2O_2$: C, 59.23; H, 4.64; N, 4.60. Found: C, 58.92; H, 4.49; N, 4.46.

1-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(5-bromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (4a). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide[3] **14a** and 2-

benzyloxyaniline (**11b**), compound **4a** was isolated in 74% yield as a beige foam. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.74 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.46-7.32 (m, 5H), 7.25 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.87 (m, 2H), 6.68 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 3.2, 0.7 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.22 (m, 3H), 3.26 (dd, *J* = 13.2, 4.0 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 13.2, 7.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 146.9, 138.7, 137.7, 135.7, 130.8, 130.6, 129.1, 128.6, 128.2, 124.8, 123.8, 122.2, 117.8, 113.1, 112.0, 111.7, 111.1, 101.6, 71.1, 70.2, 50.7, 47.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{24}H_{24}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 451.1016; found 451.1011.

1-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(3,5-dibromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (4b). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide[3] **14b** and 2-benzyloxyaniline (**11b**), compound **4b** was isolated in 62% yield as a white foam. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.69 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.40 (m, 5H), 7.29 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 7.25 (m, 2H), 6.87 (m, 2H), 6.69 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.56 (br s, 1H), 4.26 (dd, *J* = 13.8, 2.8 Hz, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.25 (dd, *J* = 13.3, 4.1 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 13.3, 7.2 Hz, 1H), 2.34 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 146.9, 138.6, 137.7, 135.4, 129.6, 129.4, 129.1, 128.6, 128.2, 126.1, 122.3, 122.2, 118.0, 114.1, 112.2, 112.0, 111.2, 89.6, 71.1, 70.1, 50.8, 47.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{24}H_{23}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 529.0121; found 529.0123.

1-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(5-bromo-3-methyl-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (4c). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide[3] **14c** and 2-benzyloxyaniline (**11b**), compound **4c** was isolated in 65% yield as a white foam. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.70 (dd, *J* = 1.8, 0.7 Hz, 1H), 7.49-7.30 (m, 5H), 7.22 (m, 2H), 6.89 (m, 3H), 6.75-6.54 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.58 (br s, 1H), 4.15 (m, 3H), 3.24 (dd, *J* = 13.2, 3.9 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 13.2, 7.0 Hz, 1H), 2.28 (d, *J* = 1.0 Hz, 4H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 146.9, 138.7, 137.7, 136.0, 131.1, 129.1, 128.6, 128.2, 128.1, 124.7, 122.2, 122.1, 117.8, 112.4, 112.0, 111.5, 111.1, 110.9, 71.0, 70.2, 50.4, 47.9, 9.7. HRMS (ESI): calcd. for $C_{25}H_{26}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 465.1172; found 465.1167.

1-((3-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(5-bromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (5a). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide **14a** and 3-benzyloxyaniline (**15**), compound **5a** was isolated as a beige foam in 72% yield. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.74 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.44-7.27 (m, 7H), 7.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H),

7.06 (m, 1H), 6.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.37 (m, 1H), 6.24 (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.31-3.90 (m, 4H), 3.26 (dd, *J* = 13.1, 3.1 Hz, 1H), 3.07 (m, 1H), 2.23 (br s, 1H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 160.6, 150.0, 137.9, 135.7, 130.9, 130.6, 130.5, 129.0, 128.4, 128.1, 124.9, 123.8, 113.2, 111.7, 107.1, 104.6, 101.7, 100.6, 70.3, 70.1, 50.8, 48.0. HRMS (ESI): calcd. for $C_{24}H_{24}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 451.1016; found 451.1021.

1-((3-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-(3,5-dibromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (5b). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide **14b** and 3-benzyloxyaniline (**15**), compound **5b** was isolated as beige foam in 64% yield. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.69 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.44-7.25 (m, 8H), 7.07 (m, 1H), 6.37 (m, 1H), 6.25 (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.32-3.95 (m, 4H), 3.27 (dd, *J* = 13.1, 3.4 Hz, 1H), 3.09 (m, 1H), 2.24 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 160.6, 149.9, 137.9, 135.4, 130.6, 129.5, 129.0, 128.4, 128.1, 126.2, 122.3, 114.1, 112.2, 107.2, 104.7, 100.7, 89.7, 70.3, 70.0, 50.9, 47.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{24}H_{23}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 529.0121; found 529.0126.

1-((3-(benzyloxy)phenyl)amino)-3-(5-bromo-3-methyl-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (5c). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide **14c** and 3-benzyloxyaniline (**15**), compound **5c** was isolated as a beige foam in 67% yield. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2 + D_2O) δ: 7.68 (dd, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.45-7.19 (m, 7H), 7.06 (m, 1H), 6.97 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.24 (m, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.17 (m, 3H), 3.25 (dd, *J* = 13.2, 3.4 Hz, 1H), 3.05 (m, 1H), 2.27 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 160.6, 150.0, 137.9, 136.0, 131.1, 130.6, 129.0, 128.4, 128.1, 128.0, 124.8, 122.1, 112.5, 111.5, 111.1, 107.1, 104.6, 100.6, 70.3, 70.2, 50.4, 48.0, 9.7. HRMS (ESI): calcd. for $C_{25}H_{26}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 465.1172; found 465.1178.

1-((3-(Benzyloxy)benzyl)amino)-3-(5-bromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (7a). According to the general procedure but starting from indole-epoxide **14a** and 3-benzyloxybenzylamine (**12a**), compound **7a** was isolated in 61% yield as a white foam after column chromatography (CH_2Cl_2-MeOH, 19:1 to 9:1). ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.72 (dd, *J* = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 7.47-7.21 (m, 8H), 7.18 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.88 (m, 3H), 6.44 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.16 (dd, *J* = 14.6, 4.2 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 14.6, 6.8 Hz, 1H), 3.94 (ddt, *J* = 8.1, 6.8, 3.9 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.67 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 12.1, 3.7 Hz, 1H), 2.46 (dd, *J* = 12.1, 8.5 Hz, 1H), 2.37 (br s, 2H).

^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.5, 142.0, 137.7, 135.8, 130.8, 130.7, 130.0, 129.1, 128.5, 128.1, 124.6, 123.6, 121.2, 115.2, 113.9, 113.0, 111.9, 101.3, 70.4, 69.6, 53.9, 52.4, 50.9. HRMS (ESI): calcd. for $C_{25}H_{26}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 465.1172; found 465.1179.

1-((3-(Benzyloxy)benzyl)amino)-3-(3,5-dibromo-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (7b). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide **14b** and 3-benzyloxybenzylamine (**12a**), compound **7b** was isolated in 50% yield as a white foam after column chromatography (CH_2Cl_2-MeOH, 19:1 to 9:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.71 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.46-7.17 (m, 9H), 6.91 (m, 2H), 6.84 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.12 (dd, *J* = 14.6, 4.1 Hz, 1H), 4.03 (dd, *J* = 14.7, 6.5 Hz, 1H), 3.92 (ddt, *J* = 8.0, 6.6, 3.9 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 12.2, 3.7 Hz, 1H), 2.45 (dd, *J* = 12.2, 8.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.0, 140.8, 136.8, 134.7, 129.6, 128.84, 128.77, 128.6, 128.0, 127.5, 125.6, 121.9, 120.6, 114.7, 113.6, 113.5, 111.4, 89.2, 69.9, 68.8, 53.4, 51.4, 50.3. HRMS (ESI): calcd. for $C_{25}H_{25}Br_2N_2O_2$ $[M + H]^+$ 543.0277; found 543.0275.

1-((3-(Benzyloxy)benzyl)amino)-3-(5-bromo-3-methyl-1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (7c). According to the general procedure, but starting from indole-epoxide **14c** and 3-benzyloxybenzylamine (**12a**), compound **7c** was isolated as a white foam in 57% yield after column chromatography (CH_2Cl_2-MeOH, 19:1 to 9:1). ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ: 7.70 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.49-7.31 (m, 5H), 7.26 (m, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.92 (m, 3H), 6.85 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 14.3, 4.1 Hz, 1H), 3.94 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 2.94 (br s, 2H), 2.63 (dd, *J* = 12.1, 3.4 Hz, 1H), 2.44 (dd, *J* = 12.1, 8.3 Hz, 1H), 2.28 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125.77 MHz, CD_2Cl_2) δ: 159.5, 141.8, 137.7, 136.0, 131.0, 130.0, 129.0, 128.5, 128.3, 128.1, 124.5, 122.0, 121.2, 115.3, 113.9, 112.3, 111.7, 110.5, 70.4, 69.6, 53.8, 52.3, 50.6, 9.7. HRMS (ESI): calcd. for $C_{26}H_{28}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 479.1329; found 479.1334.

***In Vitro* BACE-1 enzyme assay.**

The activity of the compounds as BACE-1 inhibitors was assayed employing LanthaScreen TR-FRET BACE-1 Assay Kit (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) accordingly to the manufacturer's protocol. Briefly, 200 nM fluorescein-EVNLDAEFK-biotin BACE-1 substrate and 7 mU BACE-1 enzyme (human recombinant BACE-1 ectodomain,

aminoacids 1-460, proBACE-1 form) were incubated in the absence or presence of different concentrations of the tested compounds diluted in assay buffer, for 60 min at room temperature. The reaction was stopped by adding terbium-labeled anti-biotin antibody and homogenous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) was measured in an EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer, Madrid, Spain) and expressed as TR-FRET ratio (520 nm/495 nm fluorescence emission ratio, Er). Stock solutions of the compounds were prepared in DMSO at a concentration of 10 mM, and maximum DMSO content in the assay was kept under 10% in all cases. The percent inhibition was obtained by the following equation: % Inhibition = $[(Er_I - Er_{100})/(Er_0 - Er_{100})] \times 100$, where Er_I is the emission ratio from wells containing the test inhibitor, Er_{100} is the emission ratio from wells in the absence of any inhibitor (100% BACE-1 enzyme activity), and Er_0 is the emission ratio from wells with 0% BACE-1 enzyme activity (measured in the absence of BACE-1 enzyme). Concentration-response curves (six concentrations, ranging from 1×10^{-8} to 1×10^{-4} M, in duplicate) were performed for the most active compounds (% inhibition > 50% at 10μM). The potency of the compounds as BACE-1 inhibitors, expressed as IC_{50} (concentration of the test compound required to inhibit the BACE-1 activity by 50%) was calculated from the non-linear curve fitting of percentage inhibition *vs* inhibitor concentration [I] to the equation: % Inhibition = $100/\{1 + (IC_{50}/[I])\}$, using Prism version 4 software (GraphPad, La Jolla, CA). Statistics were calculated from two independent experiments. The BACE-1 inhibitor **OM99-2** (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) (3 μM) was included as reference inhibitor in all the experiments. The IC_{50} value for **OM99-2** as BACE-1 inhibitor in this assay was 27.17 ± 1.64 (n = 3), and % inhibition of **OM99-2** at 3 μM concentration was 97.51 ± 1.49 (n = 12).

AChE and BuChE inhibition assays.

The Ellman's *in vitro* inhibition assays of AChE from *Electric eel* (*Ee*AChE; 463 U/mg) and BuChE from equine serum (hsBuChE; 13 U/mg)[6] were run in phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0. Acetyl- and butyrylthiocholine iodides were used, respectively, as substrates, and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was used as the chromophoric reagent. Inhibition assays were carried out on an Agilent 8453E UV-visible spectrophotometer equipped with a cell changer. Solutions of tested compounds were prepared starting from

10 mM stock solutions in DMSO, which were diluted with aqueous assay medium to a final content of organic solvent always lower than 1%. All compounds were preliminarily tested at 10 μM concentration and, for the most active ones (% inhibition > 50%), IC_{50}s were determined. AChE inhibitory activity was tested in a reaction mixture containing 100 μL of a solution of AChE (0.9 U/mL in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0), 100 μL of a 3.3 mM solution of DTNB in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 6 mM $NaHCO_3$, 100 μL of a solution of the inhibitor (six to seven concentrations ranging from 1×10^{-4} to 1×10^{-8} M), and 600 μL of work buffer. After incubation for 20 min at 25 °C, acetylthiocholine iodide (100 μL of 5 mM aqueous solution) was added as the substrate, and AChE-catalyzed hydrolysis was followed by measuring the increase of absorbance at 412 nm for 5.0 min at 25 °C. The concentration of compound which determined 50% inhibition of the AChE activity (IC_{50}) was calculated by nonlinear regression of the response/log(concentration) curve, using Prism version 5 software (GraphPad, La Jolla, CA). BuChE inhibitory activity was assessed similarly using butyrylthiocholine iodide as the substrate.

Abeta aggregation and fibrillogenesis: ThT fluorescence assays.

A known spectrofluorimetric method,[7] based on fluorescence emission of ThT, was followed. To obtain batches of $A\beta_{1-40}$ free from preaggregates, commercial samples (purity >95%; EzBiolab, Carmel, USA) were dissolved in HFIP, lyophilized and stored at -20 °C. The solution of ThT (25 μM) used for fluorimetric measures was prepared in phosphate buffer 0.025 M, pH 6.0, filtered through 0.45 μm nylon filters and stored at 4 °C. Test samples were prepared in phosphate buffered saline (PBS; 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4), with 30 μM Aβ peptide concentration, and contained 2% HFIP and 10% DMSO as the cosolvents. Blank samples were prepared for each concentration, devoid of peptide, and their fluorescence value subtracted from the corresponding fluorescence values of coincubation samples. As the control, a sample of peptide was incubated in the same PBS/2% HFIP/10% DMSO buffer, without inhibitor. Incubations were run in triplicate at 25 °C for 2 h. Fluorimetric measures were performed in a 700 μL cuvette with a Perkin–Elmer LS55 spectrofluorimeter, using FLWinlab program. 470 μL of ThT solution were mixed with 30 μL of sample, and the resulting fluorescence measured with parameters set as follows: excitation at 440 nm (slit 5 nm); emission at 485 nm (slit 10 nm); integration

time 2 s. Biological activity was determined as percent of inhibitory activity V_i for each concentration, according to the formula:

$V_i = 100 – [(F_i – F_b)/F_0] \times 100$

where F_i is the fluorescence value of the sample, F_b its blank value, and F_0 the fluorescence value of Aβ control (already subtracted of its blank). For the most active inhibitor **7c**, IC_{50} value was determined by testing in duplicate six concentrations, ranging from 200 to 0.1 μM. Statistics from two independent experiments were calculated using Prism version 5 software.

REFERENCES

1. Hugon, B.; Anizon, F.; Bailly, C.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Léonce, S.; Hickman, J.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. Synthesis and biological activities of isogranulatimide analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5965-5980.

2. Li, Y.; Chen, S.-H.; Ou, T.-M.; Tan, J.-H.; Li, D.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S. Syntheses and characterization of nimesulide derivatives for dual enzyme inhibitors of both cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2074-2083.

3. (a) MacMillan, K. S.; Naidoo, J.; Liang, J.; Melito, L.; Williams, N. S.; Morlock, L.; Huntington, P. J.; Estill, S. J.; Longgood, J.; Becker, G. L.; McKnight, S. L.; Pieper, A. A.; De Brabander, J. K.; Ready, J. M. Development of proneurogenic, neuroprotective small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1428-1437. (b) Asso, V.; Ghilardi, E.; Bertini, S.; Digiacomo, M.; Granchi, C.; Minutolo, F.; Rapposelli, S.; Bortolato, A.; Moro, S.; Macchia, M. α-Naphthylaminopropan-2-ol derivatives as BACE1 inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1530-1534.

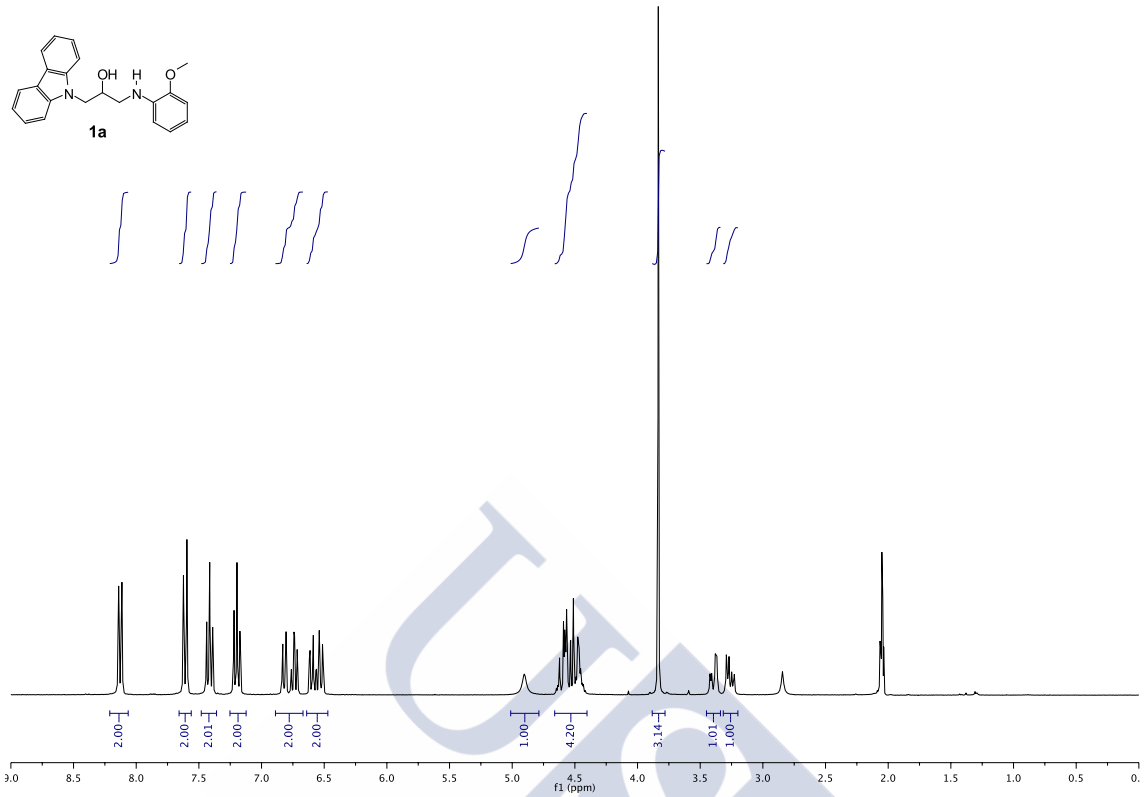
4. 3-Benzyloxybenzylamine has been already prepared by different methods: (a) Coburger, C.; Wollmann, J.; Baumert, C.; Krug, M.; Molnár, J.; Lage, H.; Hilgeroth, A. Novel insight in structure-activity relationship and bioanalysis of P-glycoprotein targeting highly potent tetrakishydroxymethyl substituted 3,9-diazatetraasteranes. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5871-5874. (b) Bell, I. M.; Gallicchio, S. N.; Abrams, M.; Beese, L. S.; Beshore, D. C.; Bhimnathwala, H.; Bogusky, M. J.; Buser, C. A.; Culberson, J. C.; Davide, J.; Ellis-Hutchings, M.; Fernandes, C.; Gibbs, J. B.; Graham, S. L.; Hamilton, K. A.; Hartman, G. D.; Heimbrook, D. C.; Homnick, C. F.; Huber, H. E.; Huff, J. R.; Kassahun, K.; Koblan, K. S.; Kohl, N. E.; Lobell, R. B.; Lynch, Jr., J. J.; Robinson, R.; Rodrigues, A. D.; Taylor, J. S.; Walsh, E. S.; Williams, T. M.; Zartman, C. B. 3-Aminopyrrolidinone farnesyltransferase inhibitors: design of macrocyclic compounds with improved pharmacokinetics and excellent cell potency. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2388-2409.

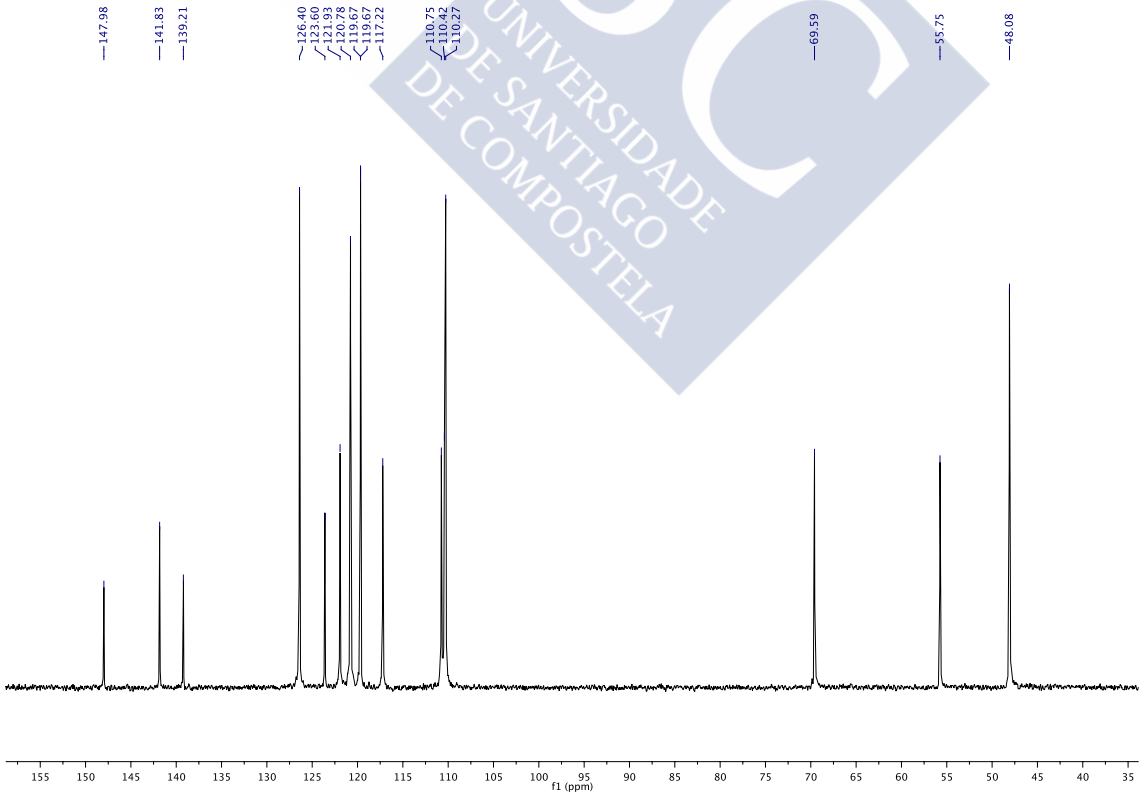
5. Paleo, M. R.; Aurrecoechea, N.; Jung, K.-Y.; Rapoport, H. Formal enantiospecific synthesis of (+)-FR900482. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 130-138.

6. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.

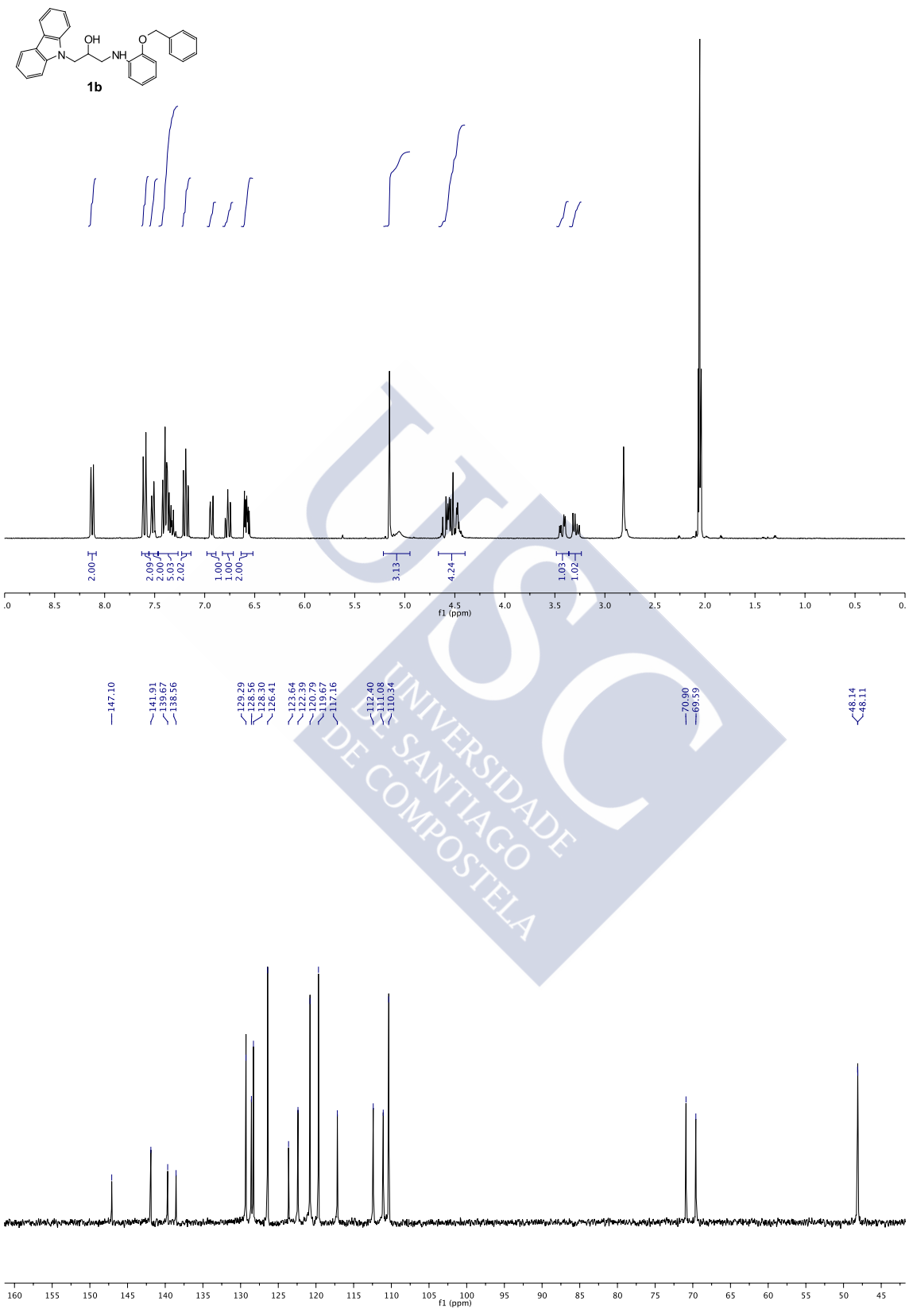
7. Cellamare, S.; Stefanachi, A.; Stolfa, D. A.; Basile, T.; Catto, M.; Campagna, F.; Sotelo, E.; Acquafredda, P.; Carotti, A. Design, synthesis, and biological evaluation of glycine-based molecular tongs as inhibitors of Aβ1–40 aggregation in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4810-4822.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

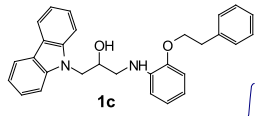




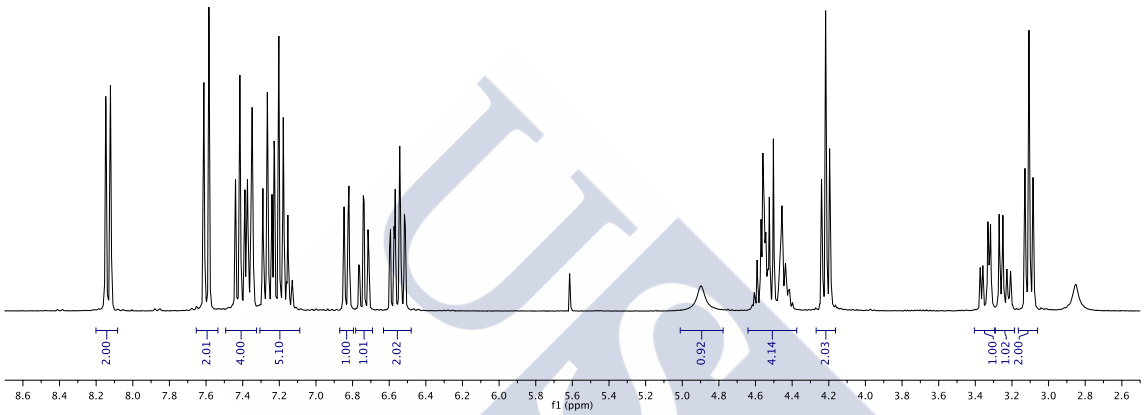
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

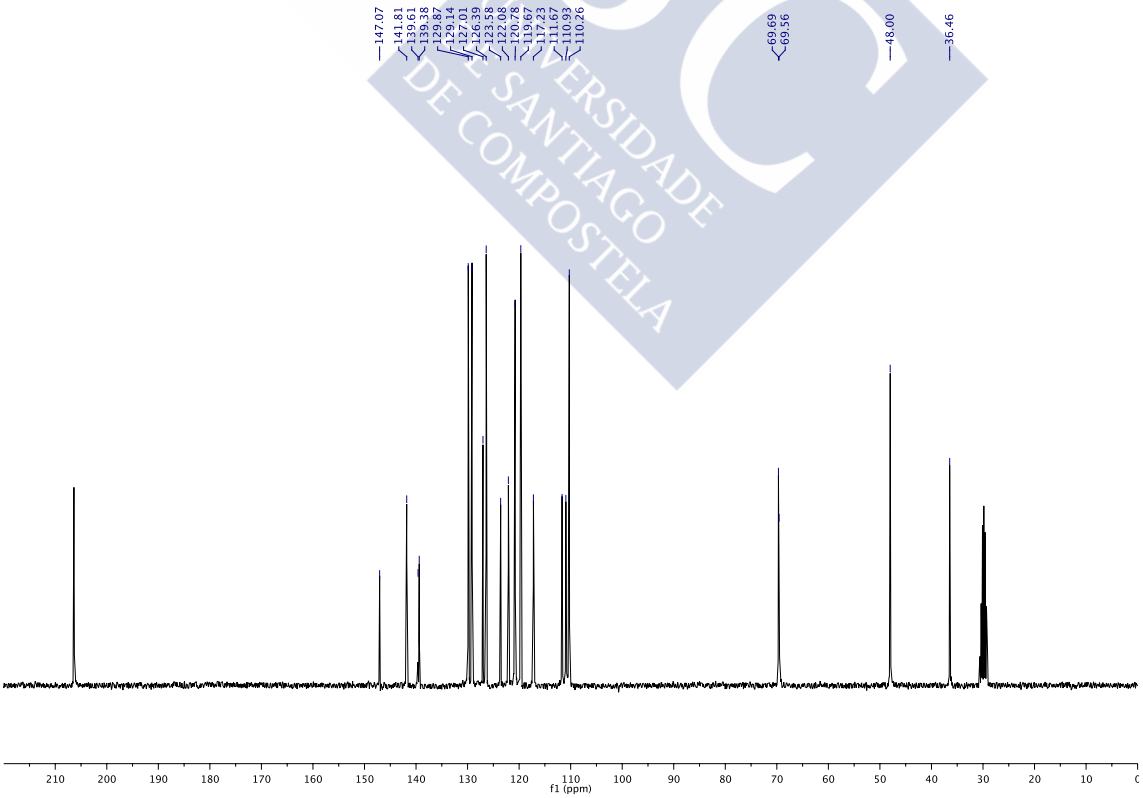


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

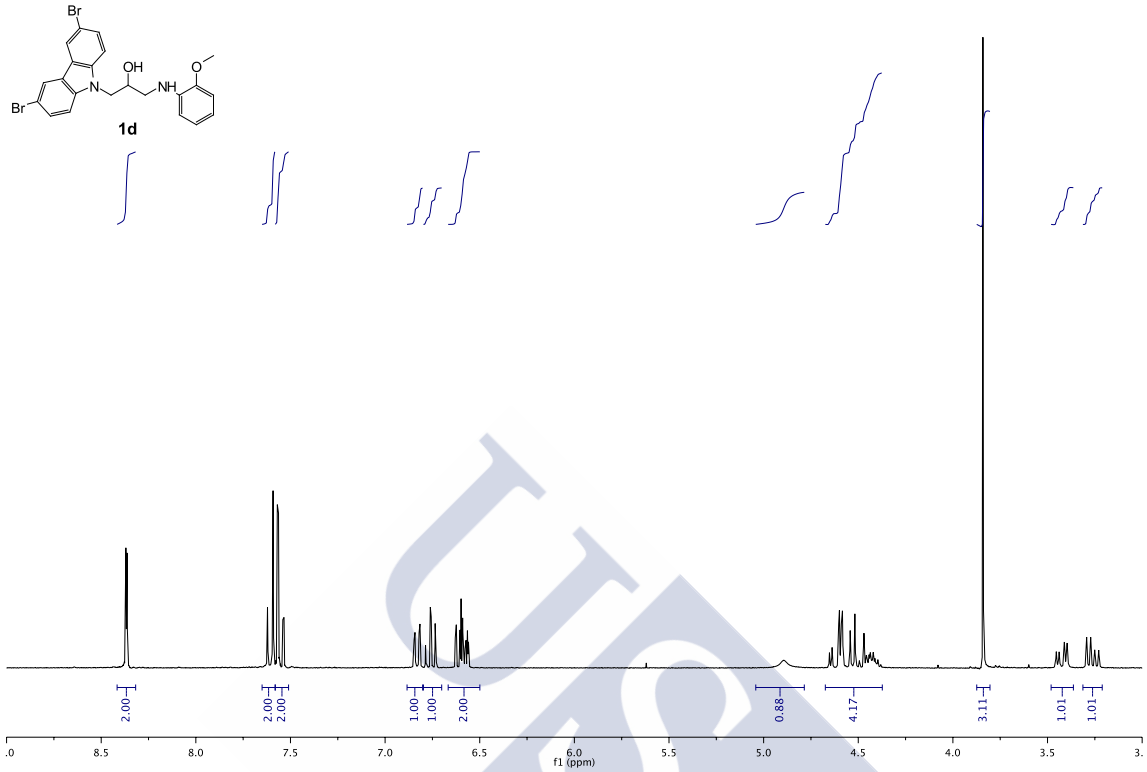


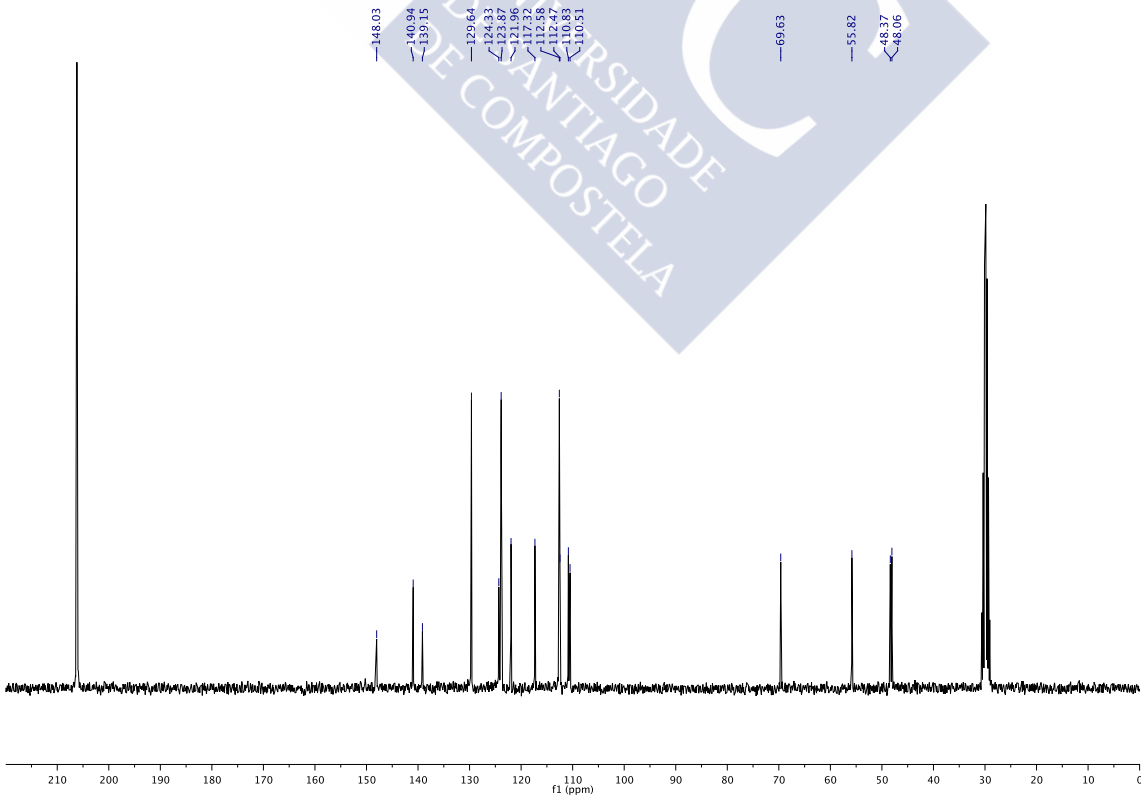
1c



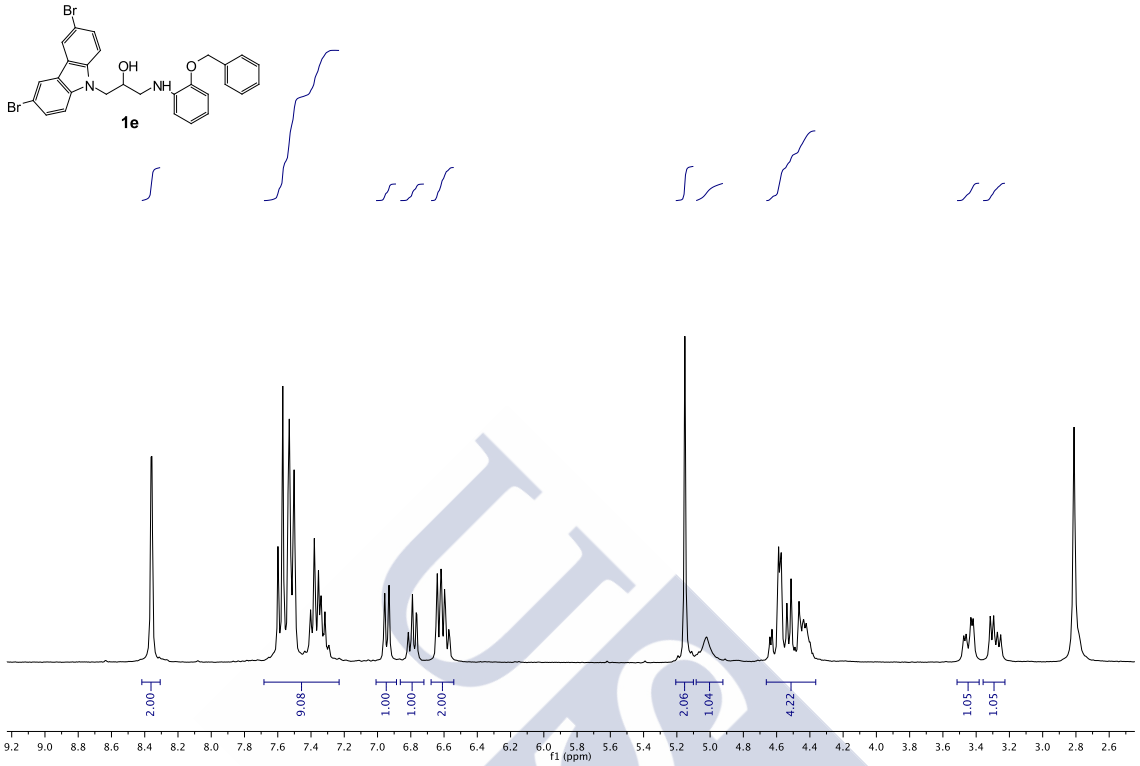


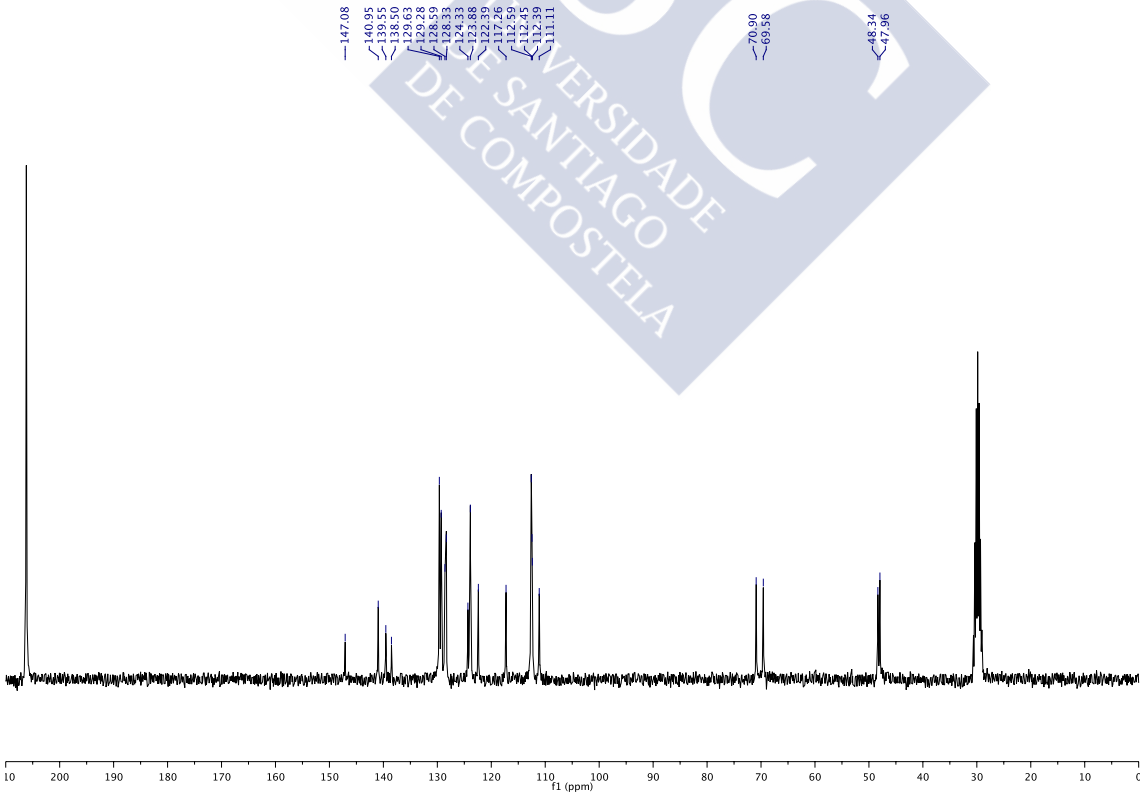
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



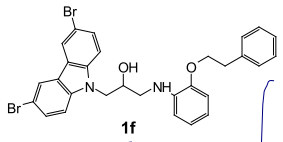


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

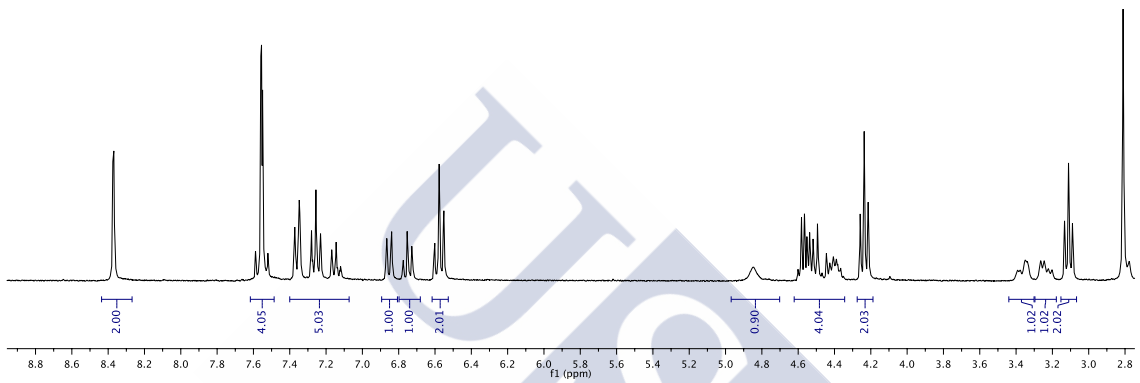


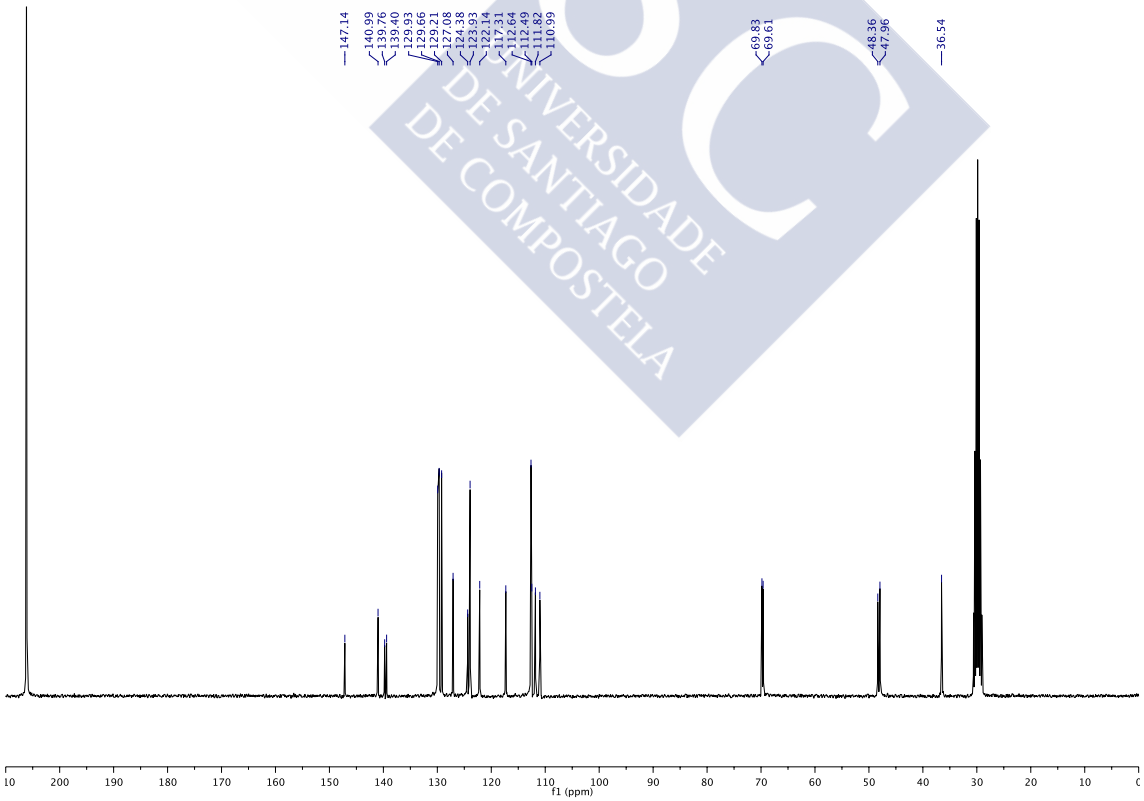


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

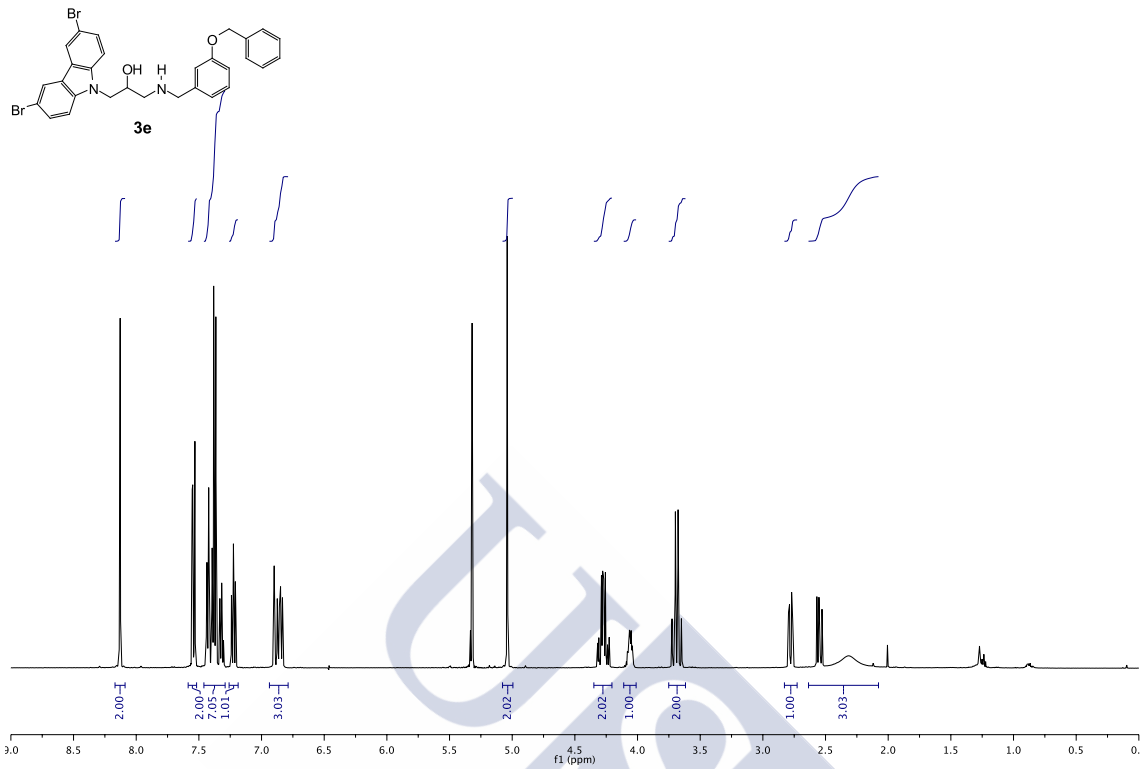


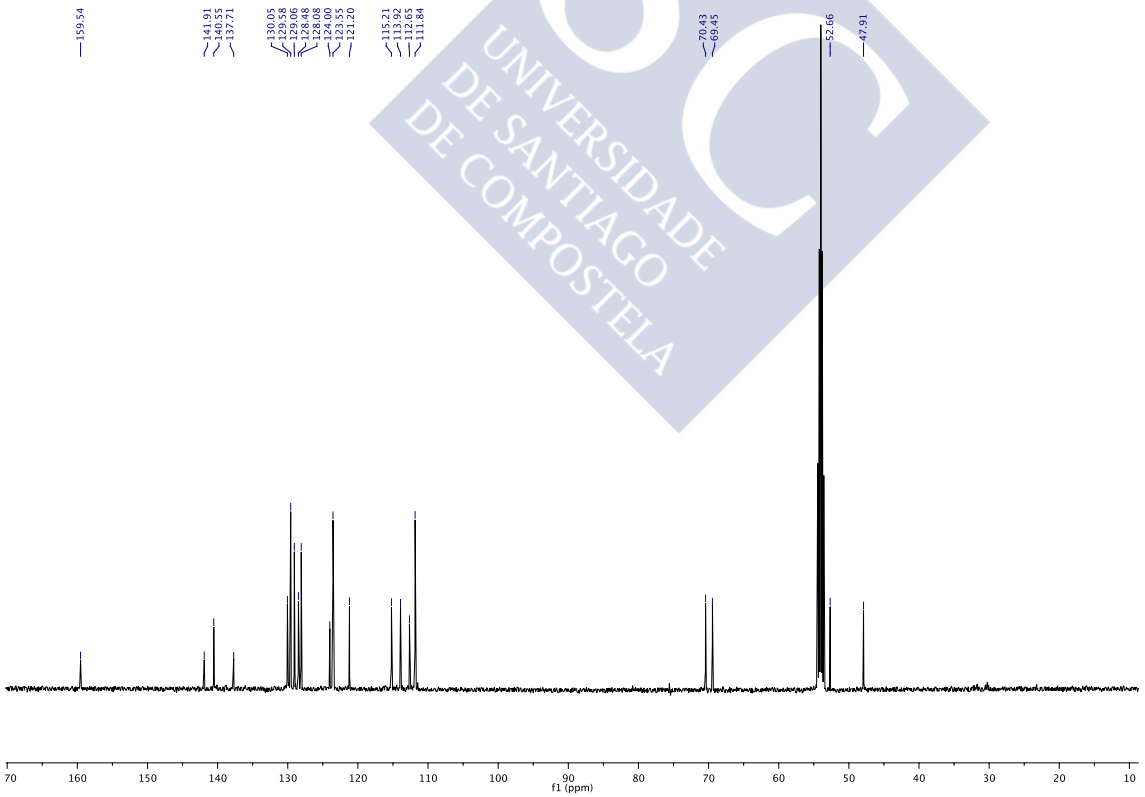
1f



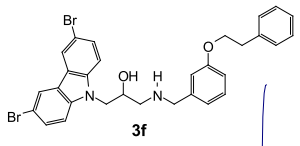


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

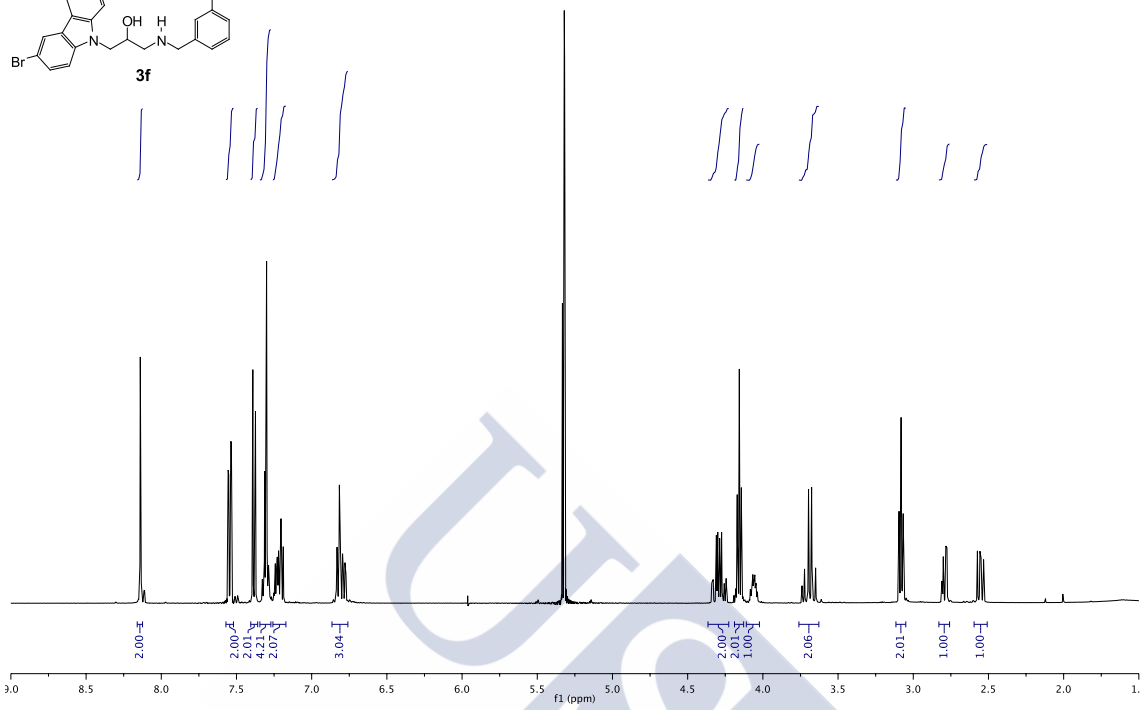


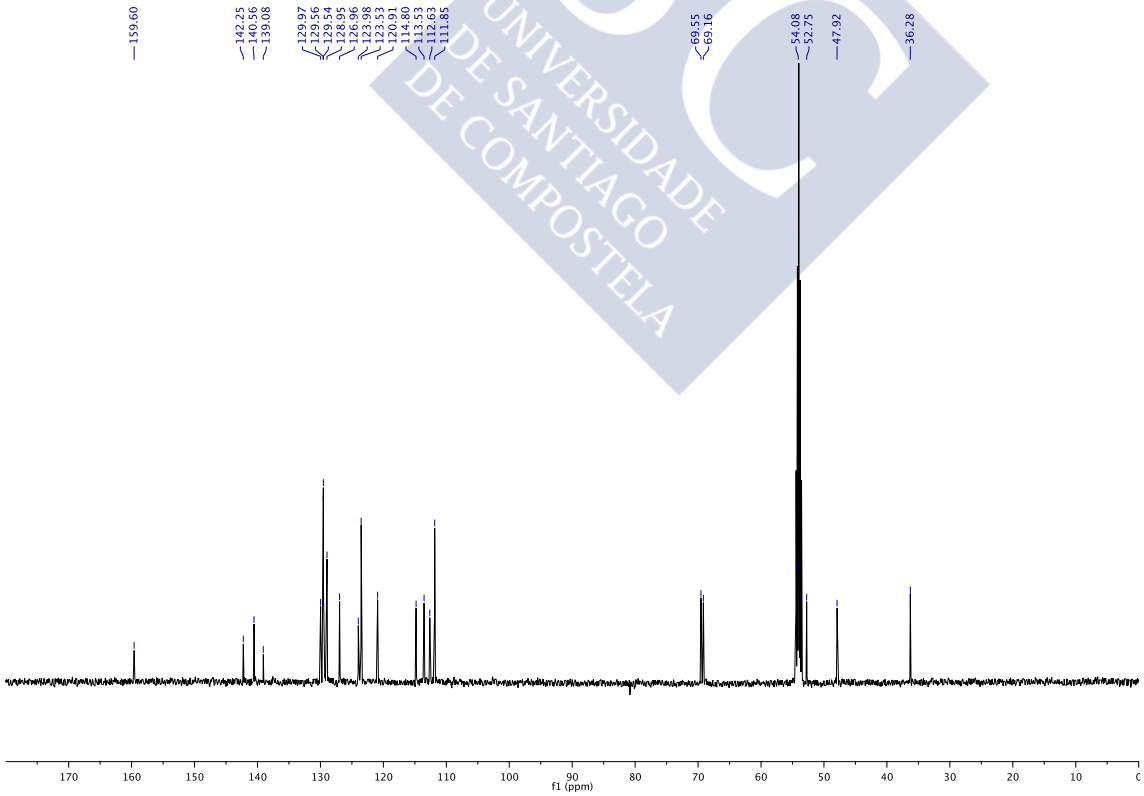


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

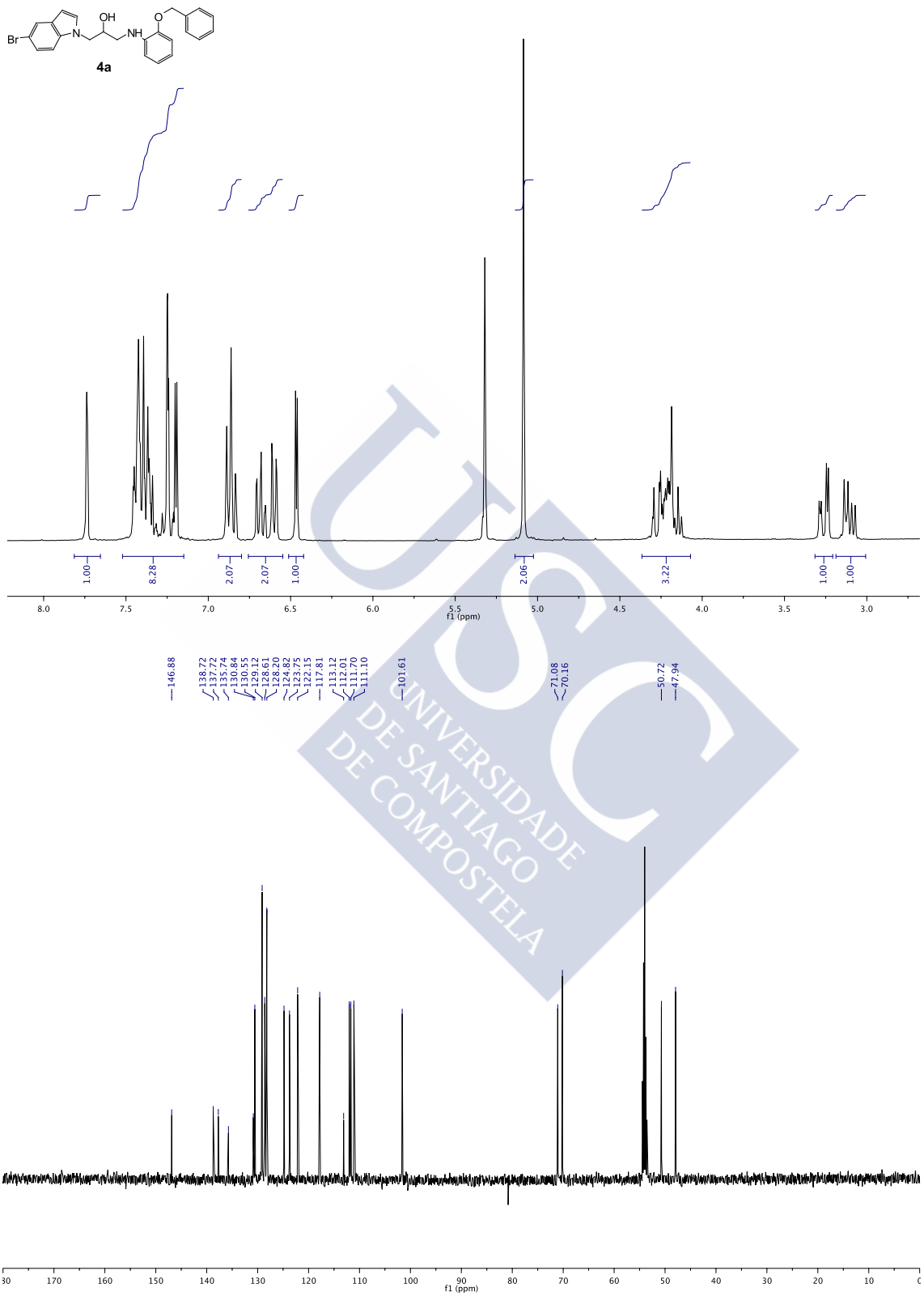


3f

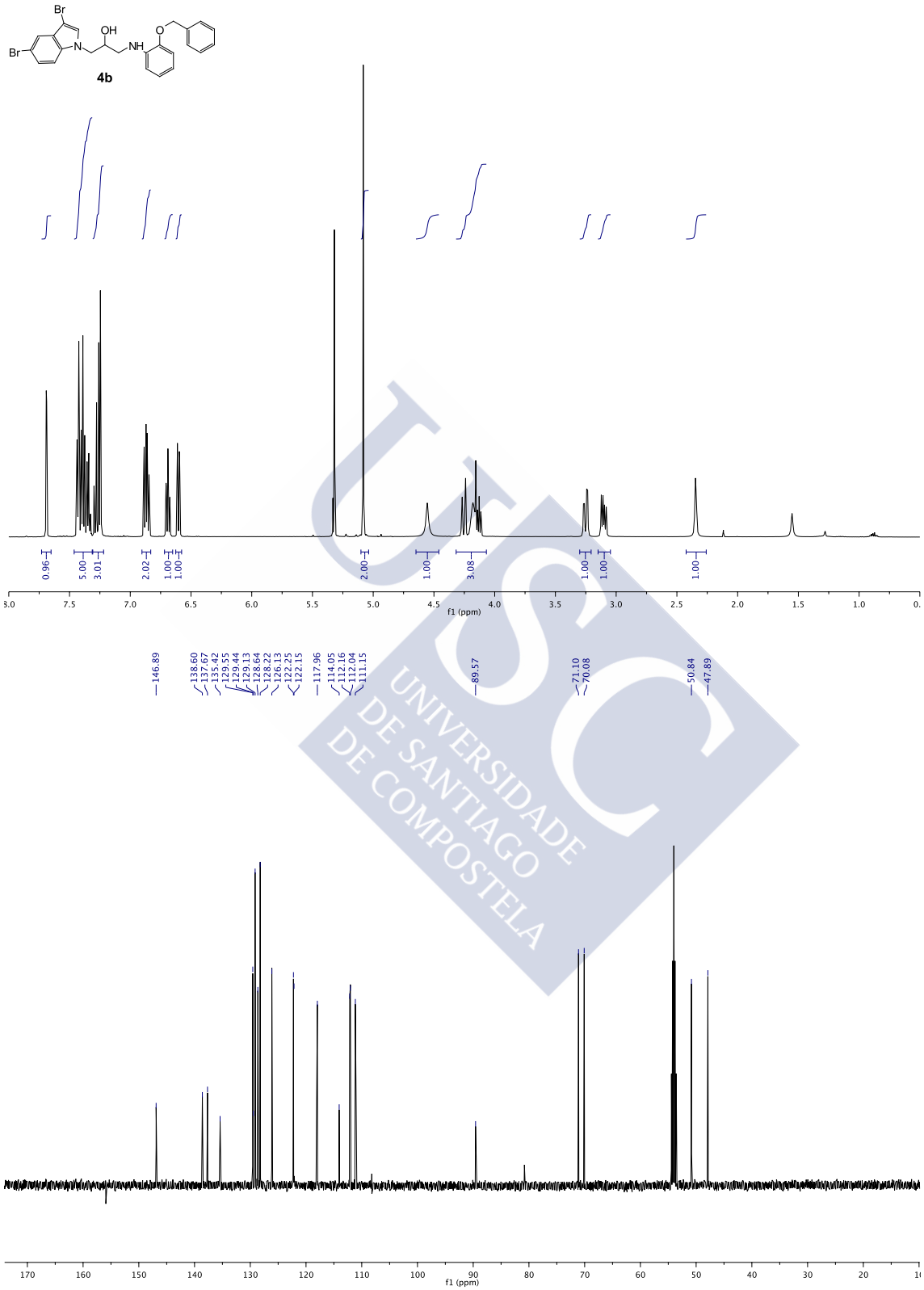




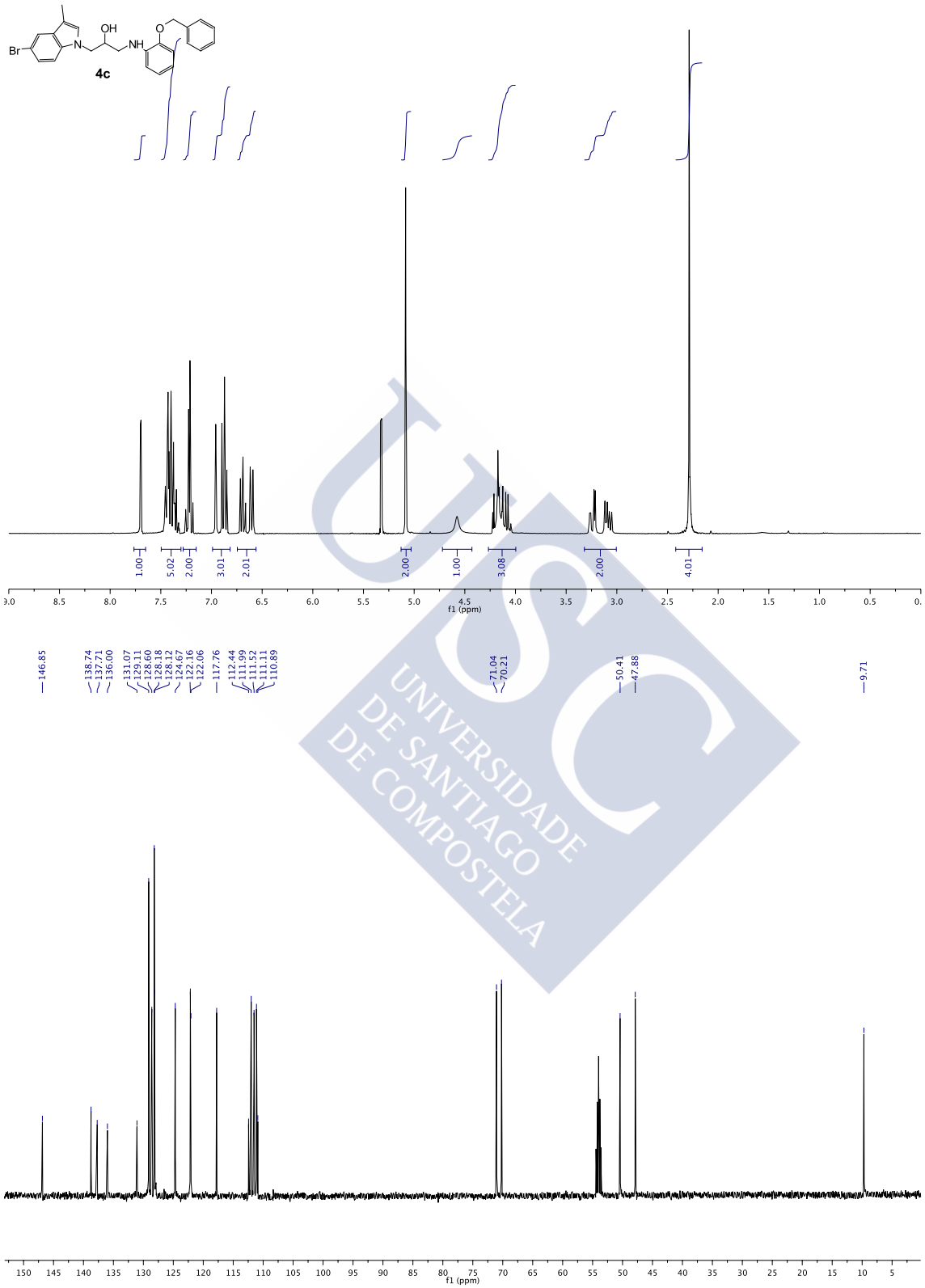
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



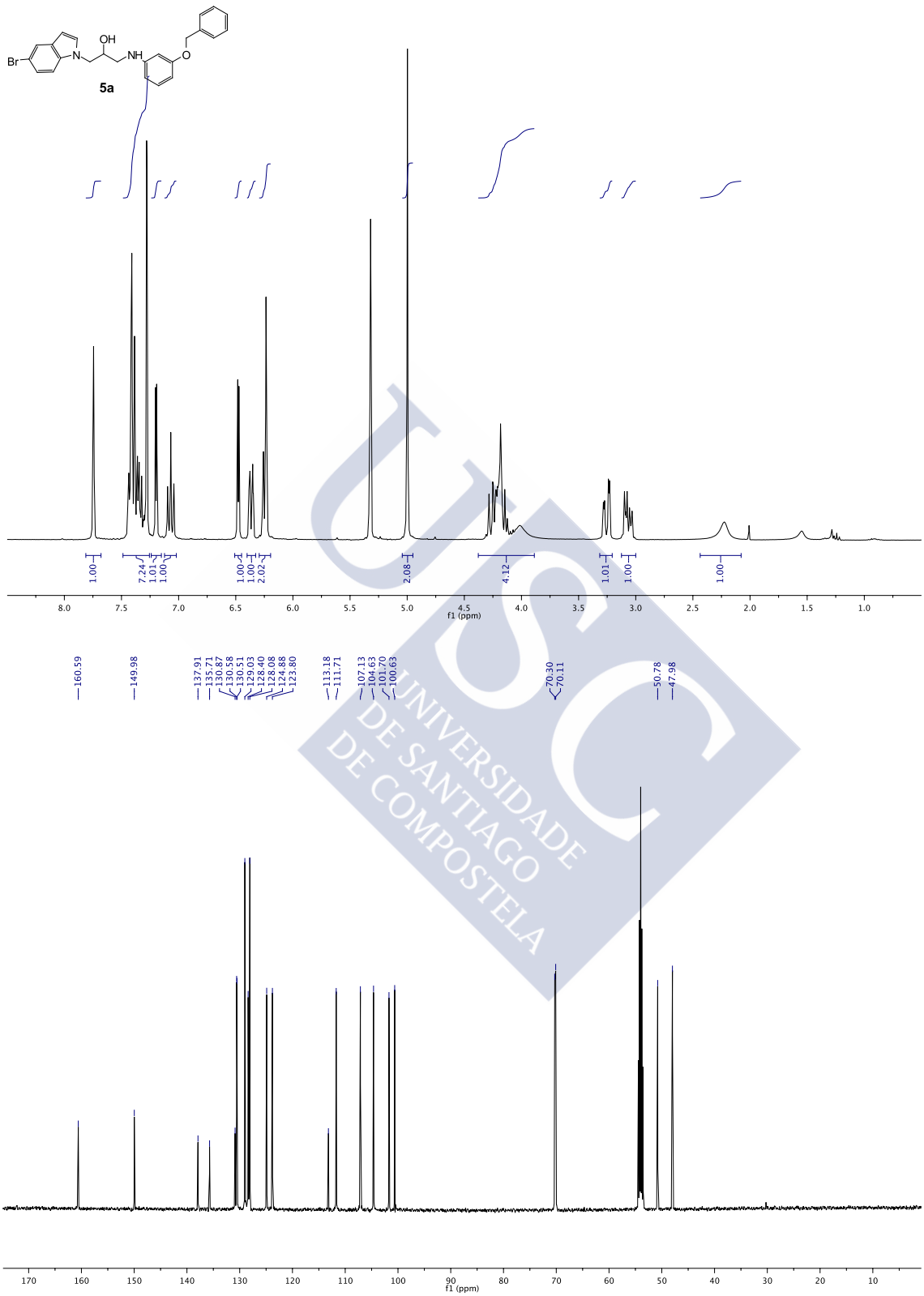
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



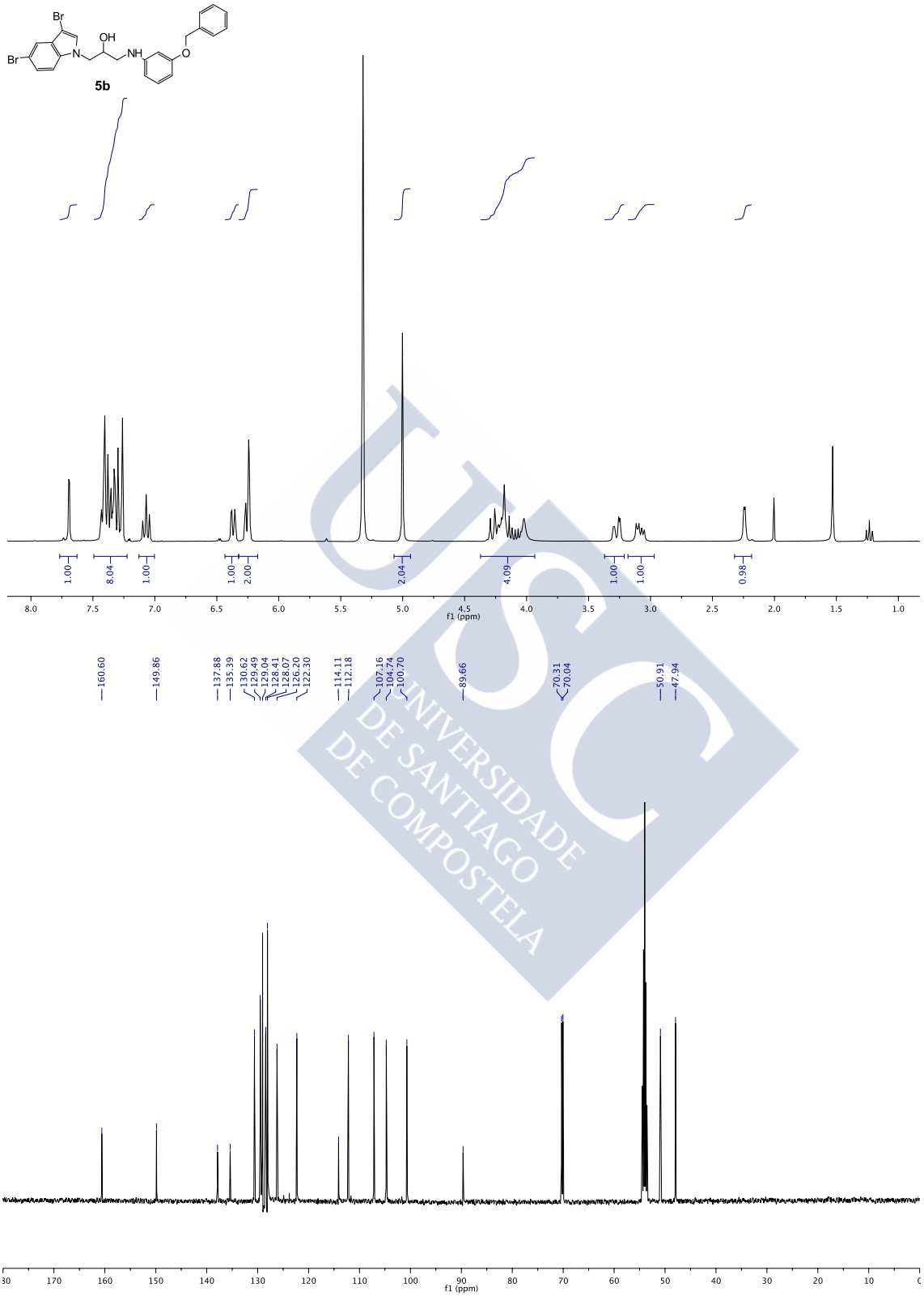
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



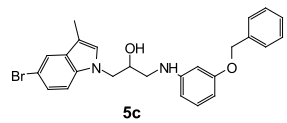
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



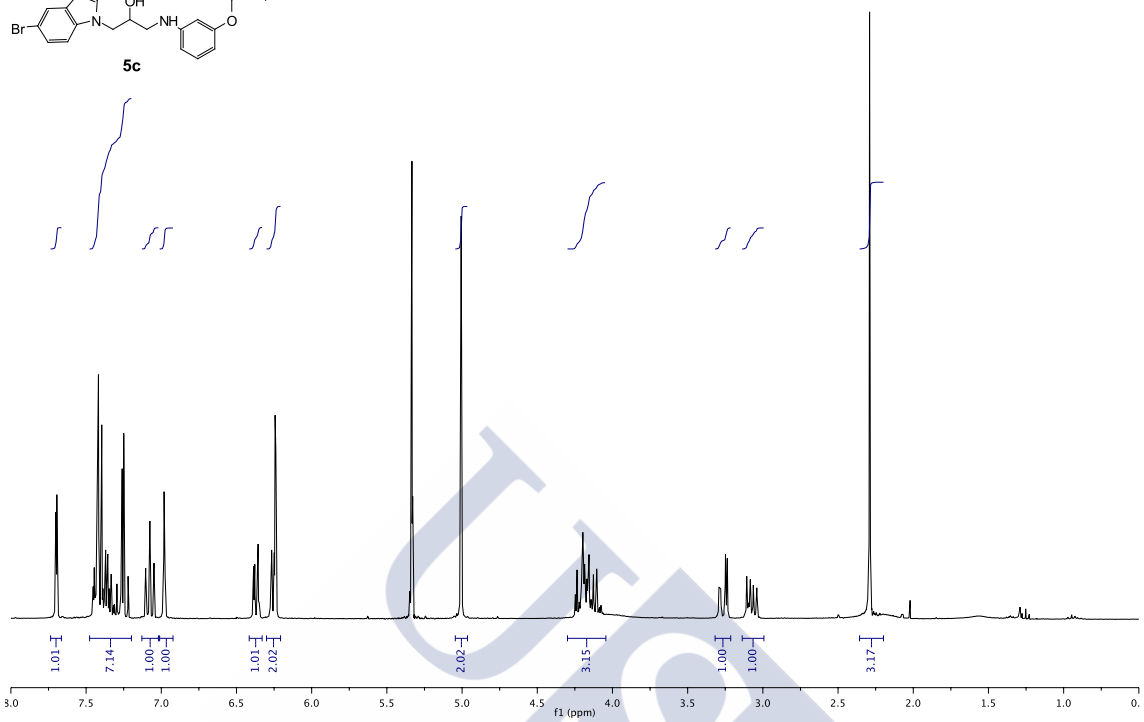
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

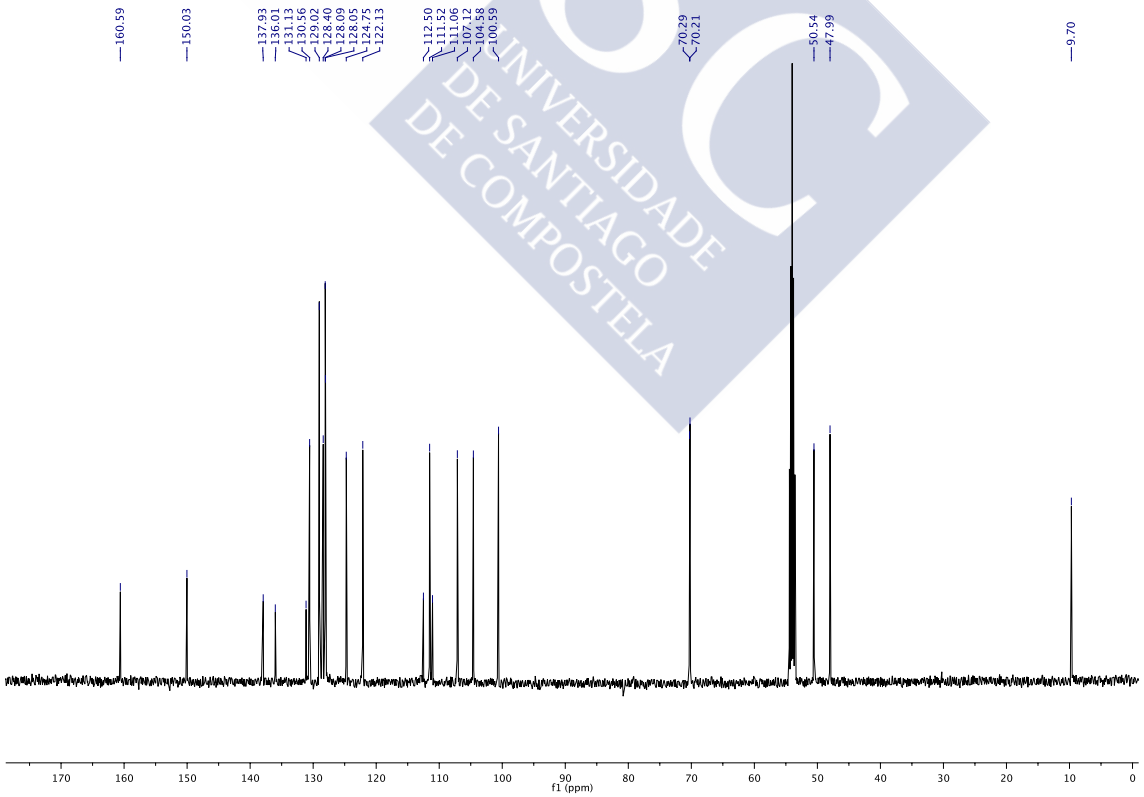


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

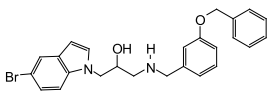


5c

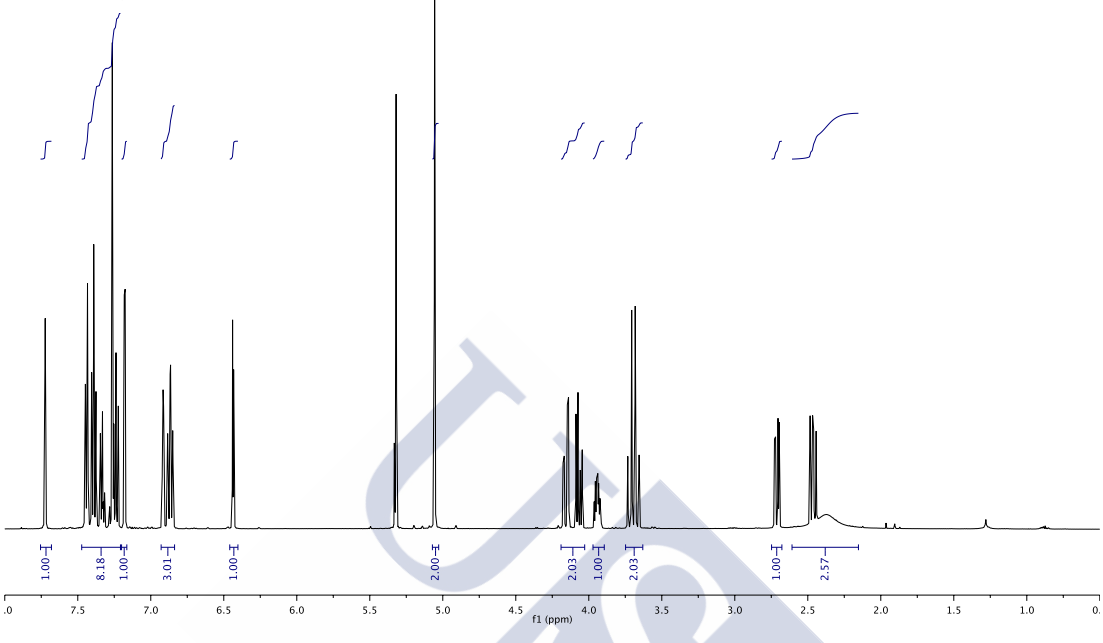


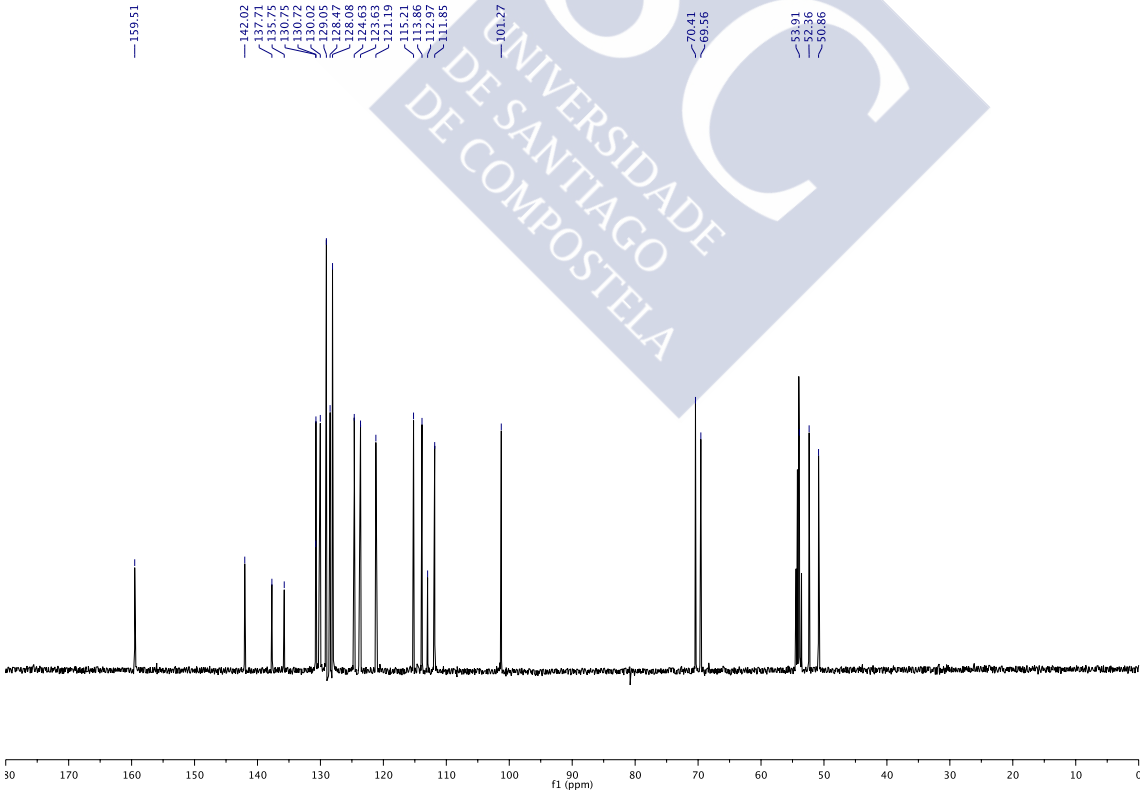


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

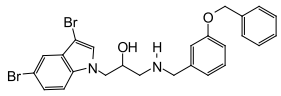


7a

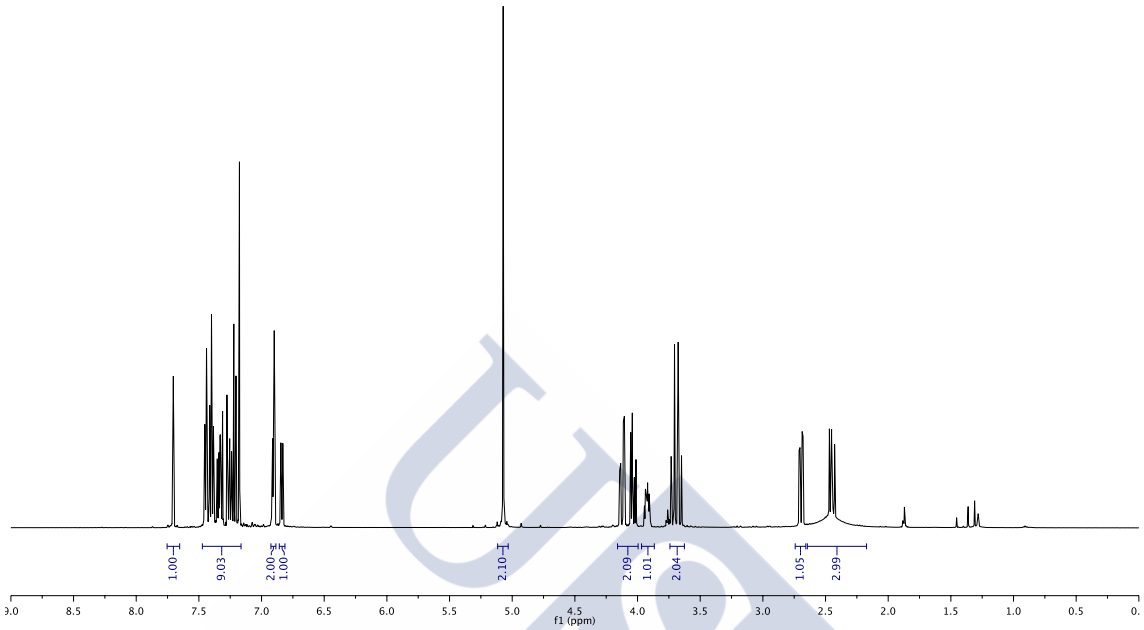


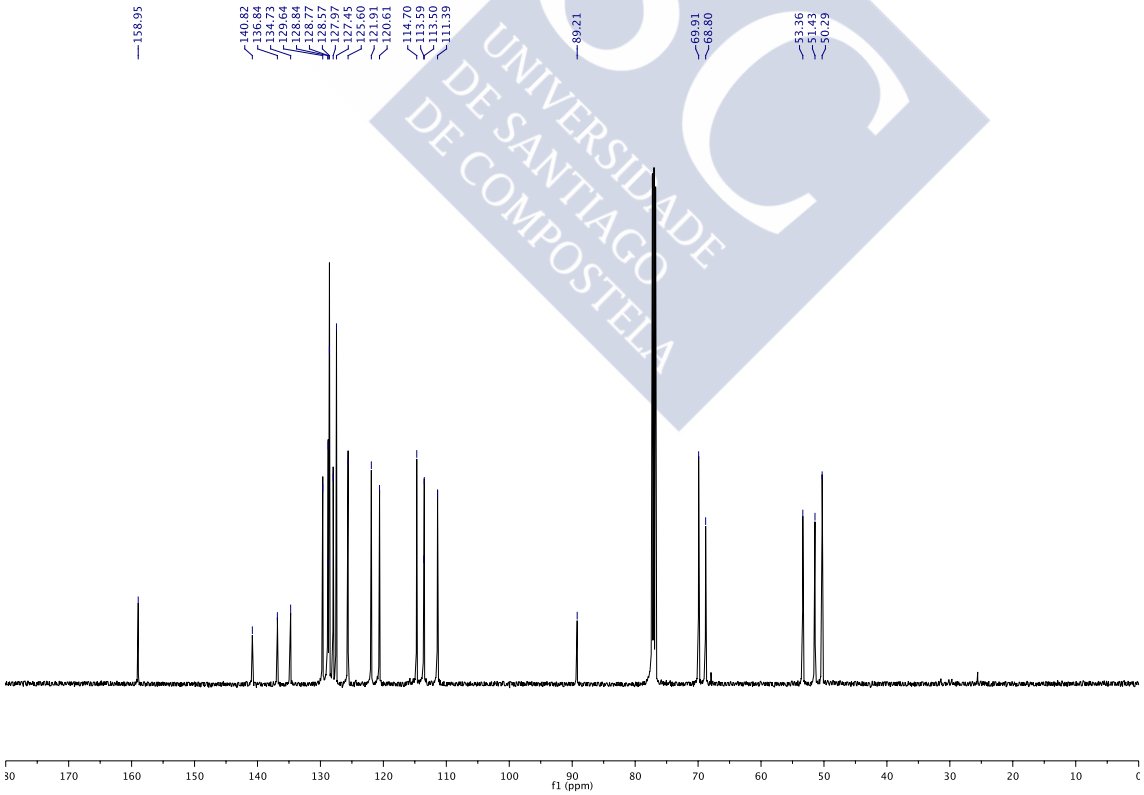


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

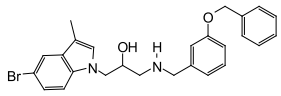


7b

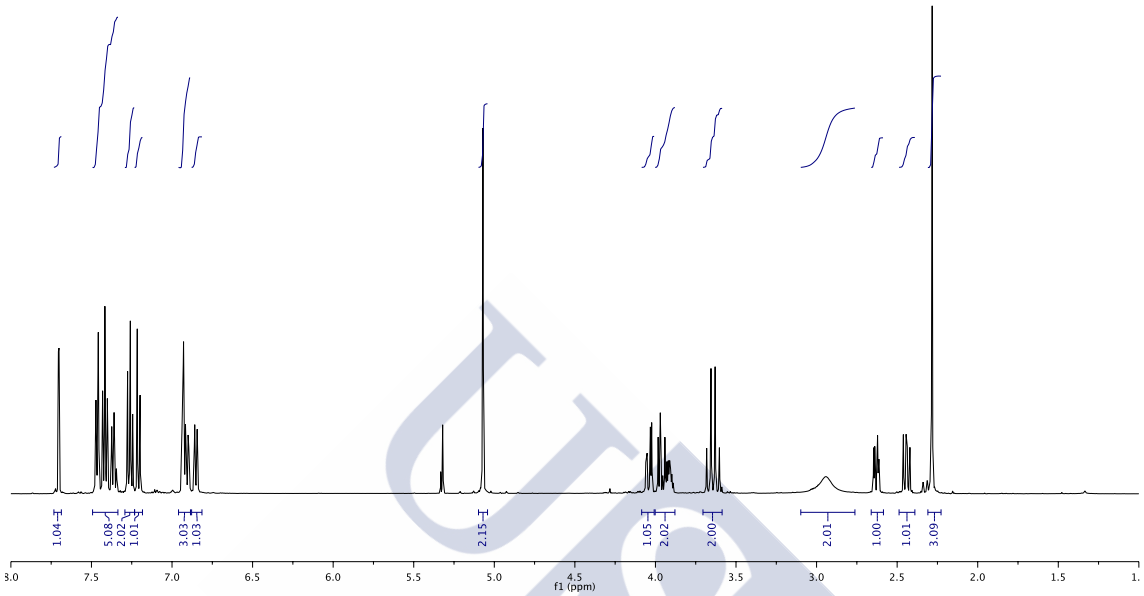


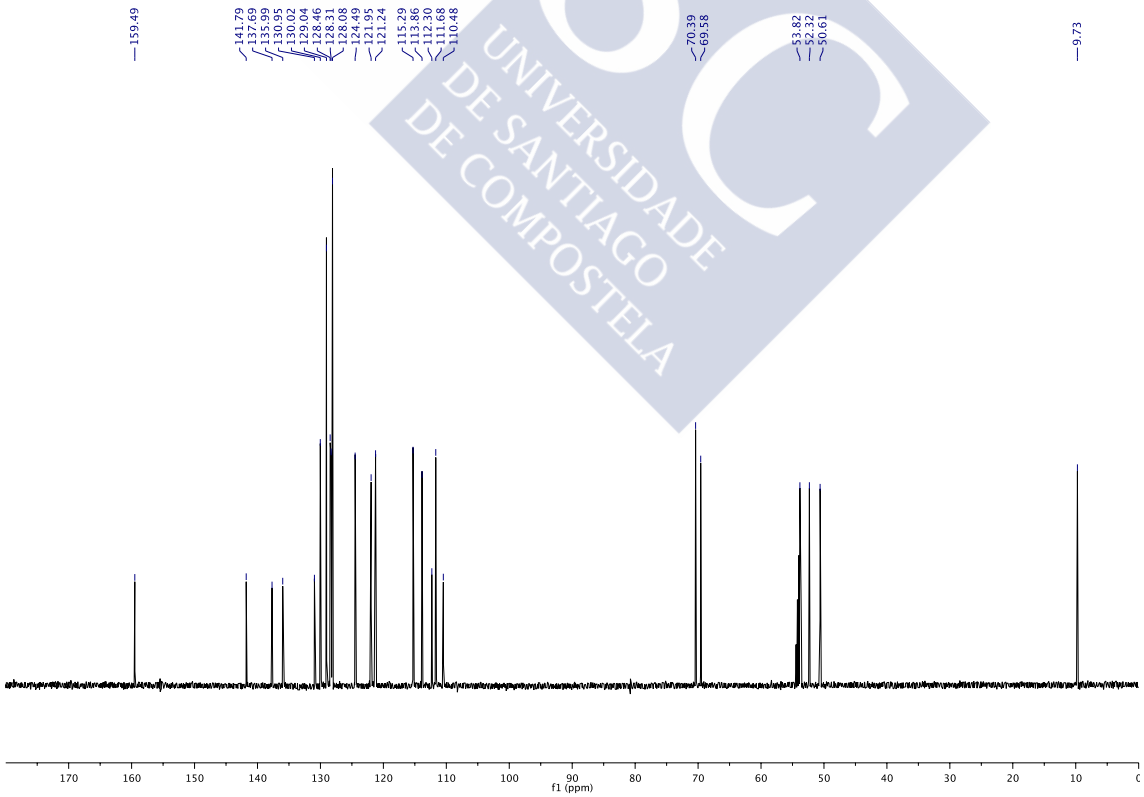


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



7c





UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA