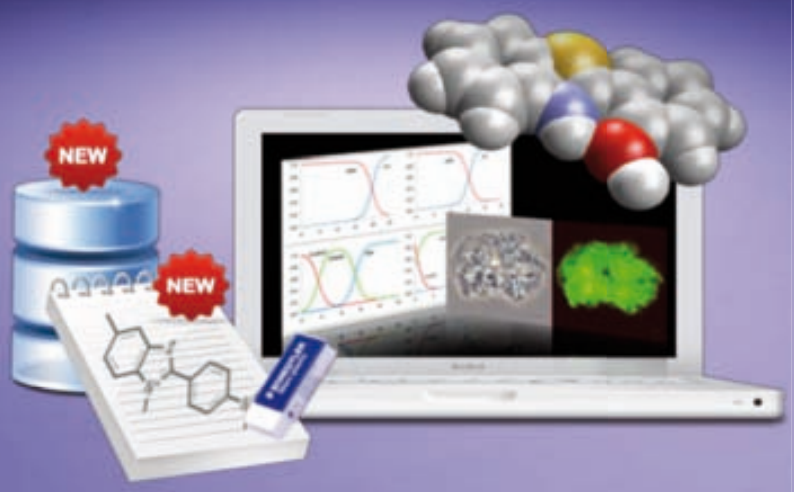
UAB

Agents quelants multifuncionals per a la malaltia d'Alzheimer

Cristina Rodríguez Rodríguez

Tesi Doctoral dirigida per la Dra. Pilar González Duarte
Programa de Doctorat en Química
Departament de Química - Facultat de Ciències

2009



CAPÍTOL 4

Agents terapèutics i de diagnosi en la MA: disseny, selecció i caracterització d'agents quelants amb propietats d'intercalació en fibres amiloides

La incorporació d'eines quimioinformàtiques com a pas previ al treball experimental ha estat globalment satisfactòria. Aquesta metodologia aplicada dins el camp de la química de coordinació, ens ha permès cercar molècules amb un determinat esquelet i predir les seves propietats en base a la seva estructura, seleccionant únicament aquells lligands amb millors característiques per a la seva posterior aplicació *in vivo*.

En aquest capítol ens hem proposat generar un agent quelant multifuncional apte per a la MA, la qual cosa requereix un disseny més acurat de l'esquelet del lligand. El nou lligand cal que compleixi els mateixos requeriments que s'havien establert en el capítol anterior (molècula comercial que pugui actuar com a agent quelant per als metalls Cu(II) i Zn(II), fàcilment iodable i amb una polaritat adequada per travessar la BBB), i alhora, presenti alta afinitat per les fibres amiloides, pugui actuar com a agent antioxidant i compleixi el conjunt de criteris mínims per esdevenir un possible fàrmac. Aquestes premisses constitueixen el punt de partida per desenvolupar el disseny de l'esquelet molecular i definir els criteris de selecció en l'etapa de cribatge virtual.

D'altra banda, gràcies als constants avenços informàtics i la seva implementació en eines quimioinformàtiques ha estat possible optimitzar el procés de cerca i selecció de lligands en les bases de dades comercials. Aquests nous procediments utilitzats per a la generació de quimioteques virtuals presenten moltes avantatges respecte els mètodes emprats en el capítol anterior: la inversió de temps que requereixen és mínim i la possibilitat d'incorporar diversos filtres estructurals i farmacocinètics permeten cribar els resultats obtinguts en base a futures aplicacions en medis fisiològics.

4.1. Disseny d'un agent quelant multifuncional

Les múltiples causes que hi concorren en el desenvolupament de la MA requereixen dissenyar compostos multifuncionals per al seu ús com a agents de diagnosi o teràpia de la malaltia. El punt de partida per realitzar el disseny del lligand és establir uns criteris estructurals i definir quines propietats farmacocinètiques cal considerar amb la finalitat d'assegurar l'èxit en les seves futures aplicacions. Els principals requeriments que cal que compleixi l'agent multifuncional són els següents: 1) molècula comercial que contingui un sol fragment coordinant per enllaçar a Cu(II) i Zn(II); 2) capacitat d'interaccionar amb les plaques senils on es troben els metalls; 3) facilitat de iodació; 4) ser potencialment antioxidant; 5) hidrofobicitat adequada per travessar la BBB; i 6) compliment de determinades propietats farmacocinètiques que estableixen el seu possible ús com a fàrmac.

La confluència de tots els requeriments anteriors, exigeix dissenyar un esquelet estructural bàsic que permeti incorporar fragments moleculars responsables de les seves posteriors propietats. Així, com s'ha vist a la introducció d'aquesta tesi, actualment la recerca de lligands quelants multifuncionals per a la MA utilitza l'estratègia d'incorporar a un agent quelant conegut, fragments que faciliten el seu pas a través de la BBB, milloren les propietats antioxidants o ajuden a interaccionar amb les fibres amiloides.[129-133] En canvi, la novetat en el disseny dels nostres lligands rau en utilitzar un esquelet molecular bàsic focalitzant l'atenció en les propietats intercalants de la molècula i posteriorment, incorporar fragments que permetin la coordinació als ions metàl·lics, facilitin la seva iodació i potenciïn les seves propietats antioxidants.

A fi de construir l'esquelet estructural bàsic s'ha pres com a referència una de les molècules més àmpliament utilitzada com a agent de tinció de les plaques senils i que, per tant, presenta una alta afinitat per les fibres amiloides: la ThT. Utilitzant la seva estructura com a punt de partida i modificant-la com s'indica a continuació, s'ha generat **M1**, un esquelet molecular amb propietats intercaladores i coordinants (Figura 4.1). Les principals modificacions estructurals del compost ThT han estat dues: (1) l'eliminació del grup metil enllaçat al N quaternari heterocíclic perquè la molècula esdevingui neutra. Aquesta transformació millora l'afinitat per les fibres Aβ i incrementa la seva hidrofobicitat facilitant el seu pas a través de la BBB[178]; i (2) la substitució del fragment dimetilanilina per un anell de fenol o anilina, on la posició del grup hidroxi o amina confereixi a la molècula propietats coordinants, potenciï les propietats antioxidants i faciliti la seva iodació. Aquesta darrera característica atribueix a la molècula la possibilitat d'utilitzar-se com a radiotraçador en el diagnòstic per tècniques d'imatge no invasiva tipus SPECT.

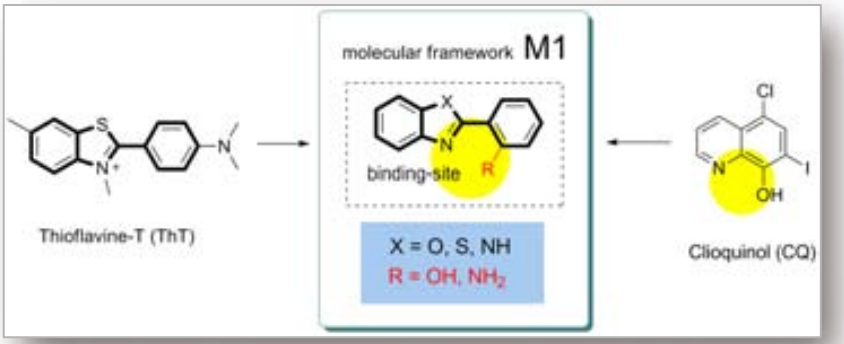


Figura 4.1. La combinació de les principals característiques de la ThT com agent intercalador i el CQ com agent quelant, proporcionen l'esquelet molecular (**M1**) amb propietats intercaladores i coordinants.

4.2. Selecció dels lligands òptims mitjançant eines quimioinformàtiques

Una vegada establert l'esquelet molecular **M1**, els objectius que formen part d'aquesta fase consisteixen en:

1. Generar quimioteques virtuals que continguin l'esquelet **M1**.
2. Aplicar filtres estructurals basats en la presència o absència de determinats grups funcionals.
3. Aplicar filtres *drug-like* basats en propietats farmacocinètiques que serveixin per descartar totes aquelles molècules que no compleixin els requeriments mínims per a ser un possible fàrmac.
4. Aplicar el filtre *log BB*, considerant únicament aquelles molècules amb capacitat de travessar la BBB.

4.2.1. Selecció de la base de dades i generació de quimioteques virtuals incloent M1

A l'actualitat, degut al constant desenvolupament d'àrees com la informàtica i la tecnologia, els catàlegs comercials de compostos químics, emmagatzemen la informació en format electrònic. És per això que molts proveïdors comercials de productes químics ofereixen els seus catàlegs de manera gratuïta via telemàtica o en CD-ROM en format d'arxiu SDF. El procediment per generar quimioteques virtuals, com s'ha explicat en el capítol anterior, implica que l'usuari hagi de cercar les pàgines webs dels proveïdors, descarregar els catàlegs, no sempre actualitzats, i utilitzar programes informàtics per poder manipular tots els arxius de forma conjunta amb la possibilitat d'excloure les molècules repetides. Aquesta sistemàtica, la qual implica una inversió important de temps és necessaria abans de fer una nova cerca.

Cada cop més, els proveïdors intenten facilitar aquesta tasca a l'usuari creant dins el seu portal web un motor de cerca de les molècules que conté el seu catàleg i garantint l'actualització de dades. Aquesta nova tendència ha crescut fins al punt que s'ha creat

eMolecules,[179] un portal web que funciona com a motor de cerca global de compostos químics i que conté aproximadament 8 milions de molècules comercials que provenen d'uns 150 proveïdors.

Per generar una quimioteca virtual, *eMolecules* disposa d'una aplicació Java (*Chemwriter*)[180] on permet dibuixar l'esquelet bàsic a cercar (*query compound*) que pot utilitzar-se com a cerca exacta o com a subestructura. La Figura 4.2 mostra l'interfície gràfica de la web i els elements principals d'aquesta. A mode d'exemple es dibuixa **M1**, en el cas que X = O i R = OH, i es fa una cerca per subestructura amb la finalitat de generar la primera quimioteca virtual. Les 2683 molècules que formen part de la quimioteca generada es presenten en forma de taula on s'indica l'estructura, el pes molecular i informació sobre les principals proveïdors que subministren cadascuna de les molècules (Figura 4.3).

4.2.2 Cribatge virtual: Aplicació de filtres i selecció dels millors candidats

Una vegada generada la quimioteca virtual, cal realitzar una criba que permeti arribar als millors lligands per continuar amb el treball experimental. El procés de selecció consisteix en aplicar uns filtres o restriccions que cal definir acuradament amb la finalitat de descartar aquelles molècules que potencialment dificultin la seva aplicació en medis fisiològics. En general, els filtres que s'utilitzen en un procès de cribatge virtual poden classificar-se en dos tipus: (a) Filtres estructurals, que es basen en la presència o absència de determinats grups funcionals;[181-185] i (b) Filtres basats en propietats farmacocinètiques.[186,187] Dins d'aquest grup es troben els filtres *drug-like*, també coneguts com a *Regles de Lipinski*,[188] i el filtre log BB. Els primers estableixen si una molècula pot actuar com a fàrmac i el darrer filtre prediu, en base a la hidrofobicitat de la molècula, la seva capacitat de travessar la BBB.

A la Taula 4.1 es mostren els filtres utilitzats en el procés de criba juntament amb el nombre de molècules resultant després d'imposar cadascuna de les restriccions. El filtre 1 (tipus estructural) consisteix en excloure totes aquelles molècules que presenten substituents en la posició *para* respecte el grup OH del fenol o el grup NH_2 de l'anell anilina, amb la finalitat de permetre la iodació en aquesta posició. Els filtres 2,3 i 4 són restriccions en base als criteris *drug-like,* definits per les regles de Lipinski: PM ≤ 500, clogP ≤ 5, nombre d'àtoms donadors d'enllaç d'hidrogen (HBD) < 5; nombre d'àtoms acceptors d'enllaç d'hidrogen (HBA) < 10.[188] A fi d'adaptar aquestes regles per a compostos que han d'actuar en el sistema nerviós central (CNS), el valor límit de PM ha estat modificat a 450 g/mol, per sobre del qual la permeabilitat a través de la BBB es fa difícil.[149,189] El programa utilitzat per manipular la quimioteca virtual generada i excloure aquelles molècules que no compleixen les regles de Lipinski ha estat *Instant Jchem.*[190]

El filtre 4, implica determinar el valor de log BB per a cada molècula d'acord amb l'equació de Clark (Taula 4.1) i descartar totes aquelles molècules que presenten un valor per sota de -0.3. Els paràmetres TPSA i clog P han estat determinats mitjançant els programes Marvinsketch[191] i clogP v.4.0[192] respectivament. Com a resultat de tot el procés de cribatge virtual s'han obtingut 36 possibles candidats (Figura 4.4), dels quals, per simplicitat molecular s'han seleccionat 3 compostos comercials, **HBX**, **HBT** i **BM**, com a millors candidats (Figura 4.5).

Figura 4.2. Portal web *eMolecules* on s'indica com es procedeix per generar una quimioteca virtual. En el motor de cerca es dibuixa l'esquelet molecular **M1** (X = O i R = OH) que correspon al *query compound.*

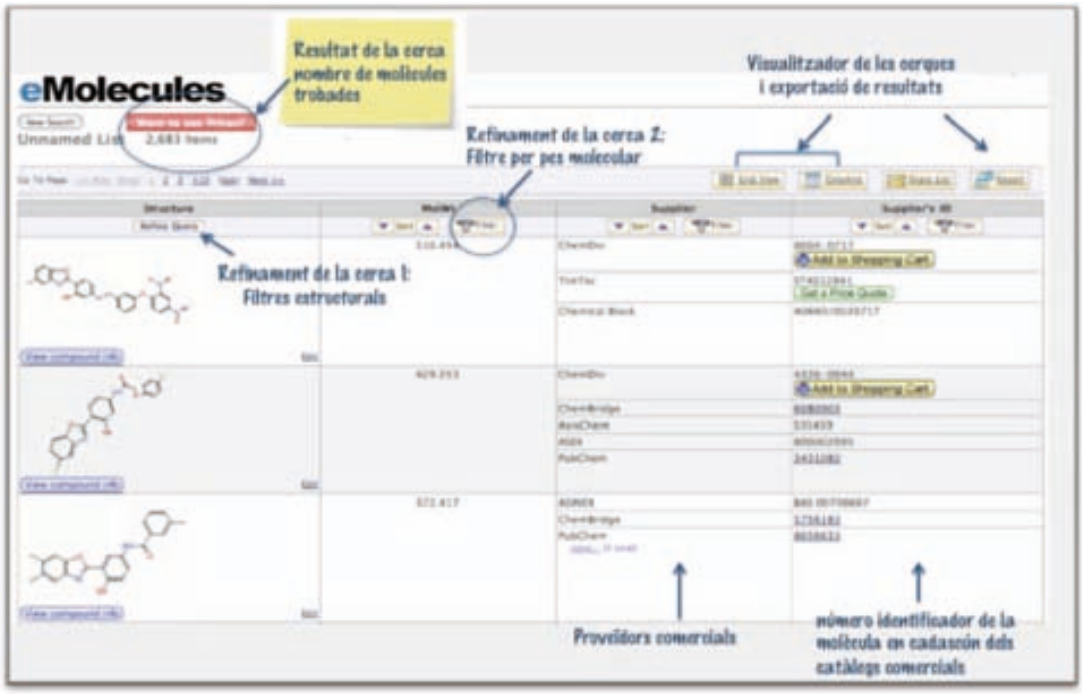


Figura 4.3. Presentació de la quimioteca virtual obtinguda mitjançant *eMolecules.* Sobre aquests resultats es poden aplicar filtres estructurals i/o seleccionar molècules en base a determinades propietats.

Taula 4.1. Nombre de compostos comercials que contenen l'esquelet molecular **M1** i satisfan les diferents restriccions imposades

M1							
X		O		S		N	
R		OH	NH_2	OH	NH_2	OH	NH_2
number of commercial cpds[a]		1986	9	804	11	61	10
Filter 1		676	6	247	4	16	5
Filter 2	MW ≤ 450	398	6	173	2	15	5
Filter 3	Lipinski's rules[b]	300	6	81	2	15	5
Filter 4	Log BB[c]	19	5	5	0	5	2

[a] cerca realitzada mitjançant eMolecules (febrer 2008)
[b] Regles de Lipinski: clog P ≤ 5; HBD < 5; HBA < 10 (HBD i HBA són definits al text)
[c] log BB = -0.0148·TPSA + 0.139·clogP + 0.152

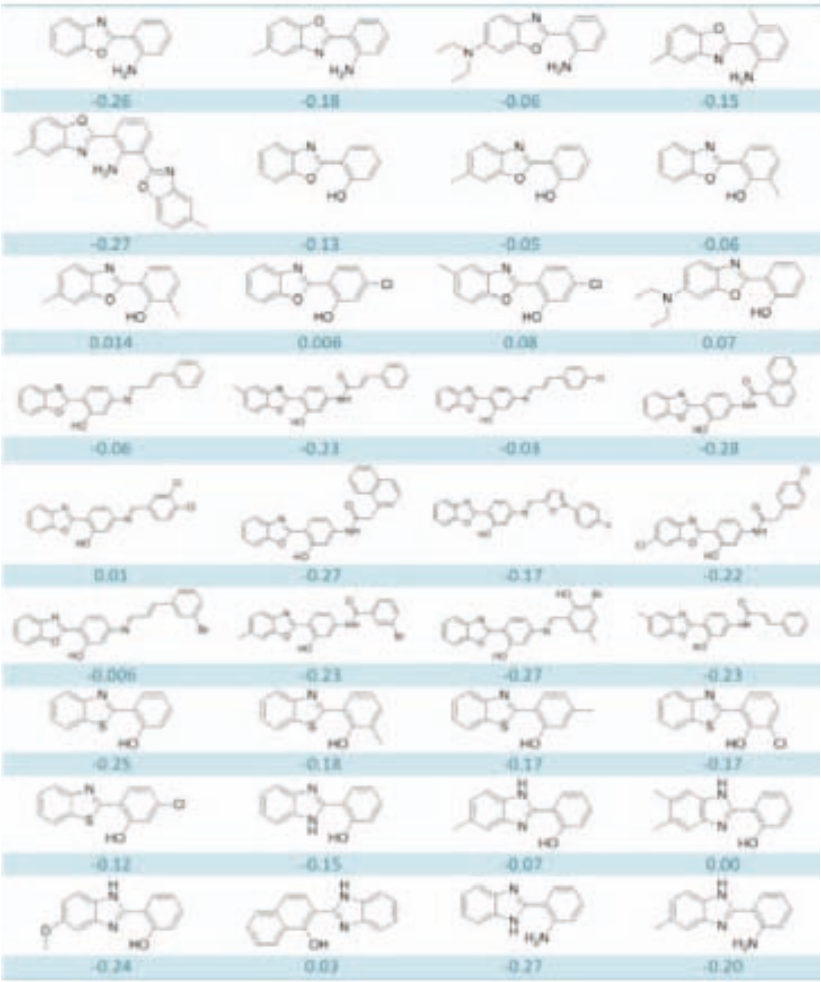


Figura 4.4. Molècules resultants del procés de cribatge virtual.
El valor log BB s'indica a sota de cada compost.

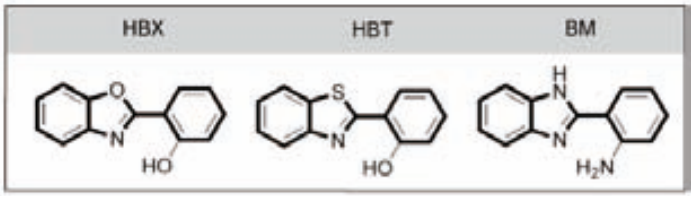
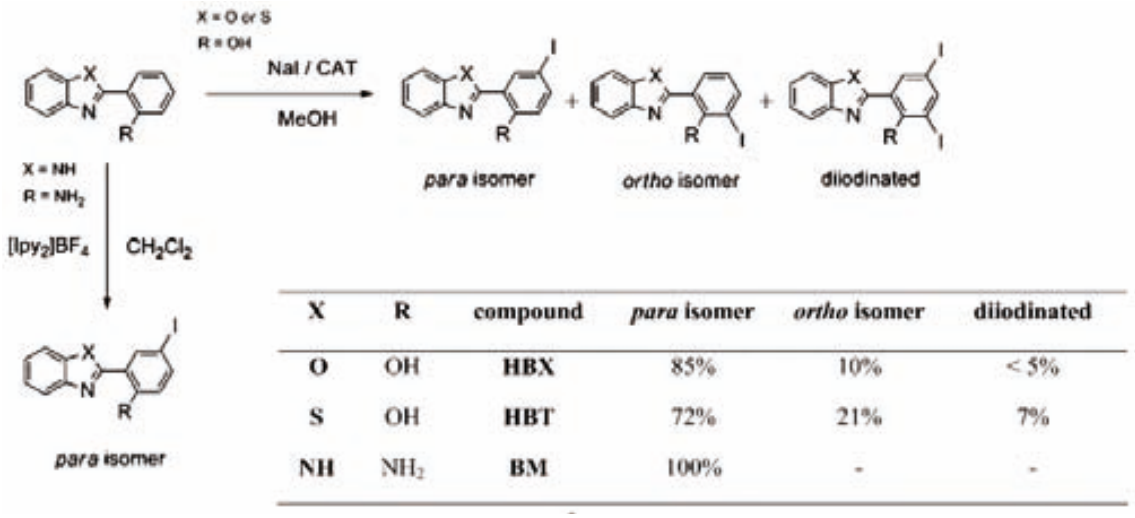


Figura 4.5. Compostos comercials seleccionats.

4.3. Reacció de iodació dels compostos HBX, HBT i BM

Actualment, la iodació de compostos aromàtics suscita un gran interès en el camp de la medicina degut a l'extensiu ús d'aquests compostos com a agents de diagnosi per a tècniques d'imatge no invasives tipus SPECT.[193-195] El mètode de iodació més emprat per al marcatge amb ^{123}I és l'oxidació de NaI mitjançant el reactiu Cloramina T (N-monocloro-p-toluensulfonamida; CAT) introduït l'any 1962 per Hunter & Greenwood.[196-198] Per aquesta raó s'ha assajat aquest procés de iodació utilitzant ^{127}I amb les tres molècules seleccionades, **HBX**, **HBT** i **BM** i s'han obtingut resultats satisfactoris únicament per a les dues primeres molècules. La molècula **BM**, en canvi, ha estat iodada utilitzant el reactiu $[Ipy_2]BF_4$.[22,23] En tots els casos, la reacció procedeix en temps curts i a temperatura ambient, obtenint-se molt bons rendiments (Esquema 4.1).

La reacció de iodació dels compostos **HBX** i **HBT**, dóna lloc als derivats iodats orientats en posició *orto* i *para* respecte el grup OH, amb clar predomini de l'isòmer *para*. D'acord amb dades de RMN, en el cru de reacció d'ambdues iodacions s'observa l'existència de petites quantitats de derivat diiodat d'acord amb dades de RMN. Contràriament, la reacció de iodació del compost **BM** amb el reactiu $[Ipy_2]BF_4$, únicament dóna lloc a l'isòmer *para*. El procediment sintètic així com l'aïllament i purificació de l'isòmer *para* de **HBXI**, **HBTI** i **BMI** es detalla en el capítol corresponent a *Procediments experimentals i Tècniques utilitzades.*



X	R	compound	*para* isomer	*ortho* isomer	diiodinated
O	OH	HBX	85%	10%	< 5%
S	OH	HBT	72%	21%	7%
NH	NH_2	BM	100%	-	-

Esquema 4.1. Reaccions de iodació dels compostos **HBX, HBT** i **BM** i rendiments obtinguts d'acord a les dades de RMN.

4.3.1. Propietats estructurals dels compostos HBXI, HBTI i BMI. Difracció de raigs X i càlculs DFT

Previ a l'avaluació de les propietats coordinatives i intercaladores d'aquests lligands és important analitzar les propietats estructurals. Amb aquest propòsit s'han obtingut els cristalls i s'han resolt les estructures dels tres lligands iodats (**HBXI**, **HBTI** i **BMI**). Les dades cristal·logràfiques així com els paràmetres de refinament de les estructures obtingudes s'indiquen a la Taula S1 (article 1 - *Annex* -). Les característiques estructurals d'aquests compostos són molt properes als seus parents no iodats.[199-201] En totes les estructures cristal·lines obtingudes s'observa l'existència d'un enllaç d'hidrogen intramolecular que té lloc entre el N(sp^2) de l'anell heterocíclic i el grup O-H (**HBXI** i **HBTI**) o el N-H (**BMI**) (Figura 4.6). La distància més curta de pont d'hidrogen es troba per a **HBTI** (1.77 Å) mentre que per al compost **BMI** aquesta distància correspon a 2.10 Å (Taula 4.2). Aquesta diferència es deu al fet que el grup OH té més capacitat de donació per establir ponts d'hidrogen que el grup NH_2. Si bé la similitud estructural que comparteixen els lligands **HBXI** i **HBTI** s'observen diferències en la distància de l'enllaç d'hidrogen, la qual s'atribueix a dos factors: (a) la influència del S o l'O en la basicitat del N(sp^2) del fragment benzoxazol (per a **HBXI**) o benzotiazol (per a **HBTI**); i (b) la diferent grandària dels heteroàtoms O i S.

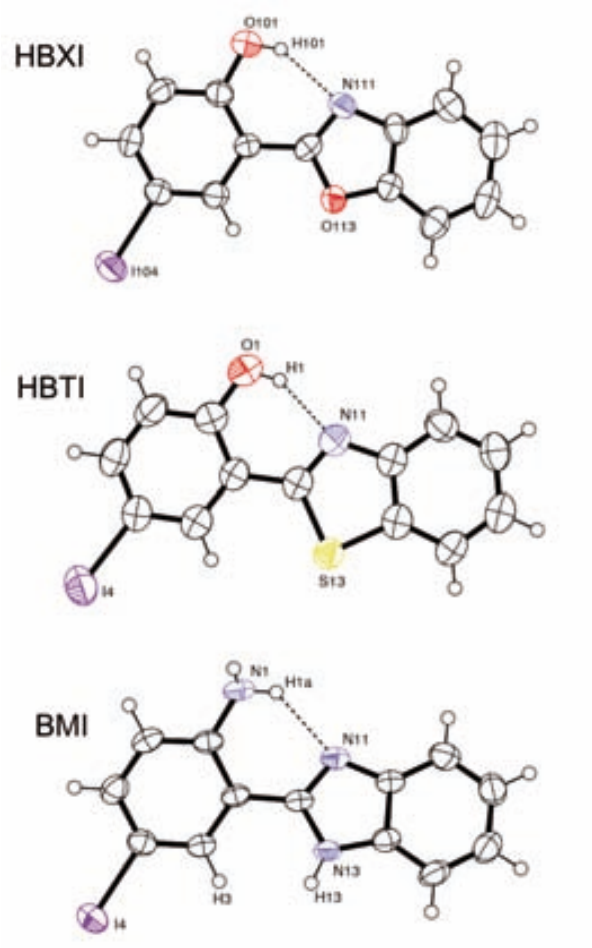


Figura 4.6. Representació en elipsoides (50% de probabilitat) dels lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI**.

Taula 4.2. Valors de distàncies (Å) i angles (º) dels ponts d'hidrogen intramoleculars en **HBXi, HBTI i BMI** obtinguts per difracció de raigs X i per càlculs DFT

	HBXI			
	O101–H101	O101···N111	H101···N111	O101–H101···N111
X-ray	0.94[a]	2.718(7)	1.90[a]	145[a]
DFT	0.99	2.670	1.80	145

	HBTI			
	O1–H1	O1···N11	H1···N11	O1–H1···N11
X-ray	0.94[a]	2.606(5)	1.77[a]	146[a]
DFT	0.99	2.625	1.74	146

	BMI			
	N1–H1a	N1···N11	H1a···N11	N1–H1a···N11
X-ray	1.03[a]	2.799(4)	2.10[a]	123[a]
DFT	1.01	2.730	1.94	132

Pel que fa a la planaritat, les molècules **HBXI** i **HBTI** presenten un angle diedre (φ) entre els fragments benzoxazol/benzotiazol i l'anell fenol de 4.6 (2) i 5.1 (1)º respectivament, amb el que es pot concloure que aquestes molècules presenten una conformació pràcticament plana. En el cas de la molècula **BMI**, l'angle φ entre els fragments benzimidazol i l'anell d'anilina és 24.4 (2)º, clarament major que en els dos casos anteriors. Aquesta diferència en els angles diedres no es tan important en les molècules no iodades, **HBX**, **HBT** i **BM** amb les quals es troben els valors de φ 3.1, 2.3 i 7.2º respectivament, molt propers a la planaritat.

Per tal d'explicar si el valor dels angles diedres obtinguts per difracció de raigs X és conseqüència dels efectes d'empaquetament de l'estructura cristal·lina o pel contrari, són deguts a les propietats químiques intrínseques de cadascuna de les molècules, s'han realitzat càlculs B3LYP en fase gas dels tres lligands. Els resultats teòrics obtinguts mostren l'existència de ponts d'hidrogen intramoleculars en les tres molècules a unes distàncies molt properes als valors experimentals obtinguts per difracció de raigs X (Taula 4.2). Com a conseqüència d'aquest enllaç d'hidrogen, les molècules **HBXI** i **HBTI** presenten un alt grau de planaritat. Contràriament, aquesta planaritat no s'observa en la molècula **BMI** degut a la

repulsió estèrica entre dos H molt propers, H3 i H13, que provoquen que l'anell benzimidazol es desviï 5º del pla que forma l'anell d'anilina (Figura 4.6). Aquest valor és notablement inferior a l'obtingut mitjançant les dades experimentals per al lligand **BMI** (24º). Aquesta diferència s'atribueix a efectes d'empaquetament cristal·lí provocats per l'existència d'un àtom de iode a l'estructura del compost. Exceptuant aquesta diferència, els valors de distàncies i angles obtinguts teòricament per a tots tres lligands són consistents amb els observats a les estructures cristal·lines (Taula 4.2).

4.3.2. Determinació de les constants d'acidesa dels lligands HBXI, HBTI i BMI

L'estudi de les constants de formació de **HBXI**, **HBTI** i **BMI** envers Cu(II) i Zn(II), exigeix conèixer prèviament les constants d'acidesa dels lligands (Ka) a les mateixes condicions experimentals. Amb aquest objectiu, s'han realitzat valoracions espectrofotomètriques dins l'interval de pH 2-11 per a cadascun dels lligands. A mode d'exemple, la Figura 4.7 mostra l'evolució espectral del lligand **HBTI** al llarg de la valoració àcid-base. Els espectres UV-vis obtinguts per als lligands **HBXI** i **BMI** es mostren a les Figures S2 i S3, respectivament (article 1 - *Annex* -).

Les valoracions espectrofotomètriques ens han permès arribar als resultats de pKa que es mostren a la Taula 4.3, on es pot observar que els lligands **HBXI** i **HBTI** presenten un únic valor de pKa que correspon a la desprotonació del fenol, mentre que en el mateix interval de pH, per al lligand **BMI**, s'observen dos valors de pKa. En base a dades bibliogràfiques, s'assigna el pKa_1 (3.65) a l'anilina protonada i el pKa_2 (7.44) al N imidazòlic.[202] Tots els valors de pKa trobats són comparables als obtinguts en dades bibliogràfiques per a sistemes molt propers i en condicions molt semblants a les utilitzades en aquest treball.[203] Per comparar la capacitat coordinant d'aquests lligands amb el clioquinol (HCQ), les constants d'acidesa d'aquest últim han estat determinades sota les mateixes condicions experimentals (Taula 4.3 i Figura S4 de l'article 1 - *Annex* -).

A partir dels valors de pKa obtinguts per a cadascun dels lligands es pot obtenir el diagrama d'especiació el qual mostra la regió de pH on predomina cada espècie. D'acord amb la Figura 4.8 es conclou que a pH fisiològic (7.4), els lligands **HBXI**, **HBTI** i HCQ estan presents exclusivament en forma neutre, mentre que el lligand **BMI**, al mateix valor de pH, coexisteix com a forma monoprotonada i totalment desprotonada.

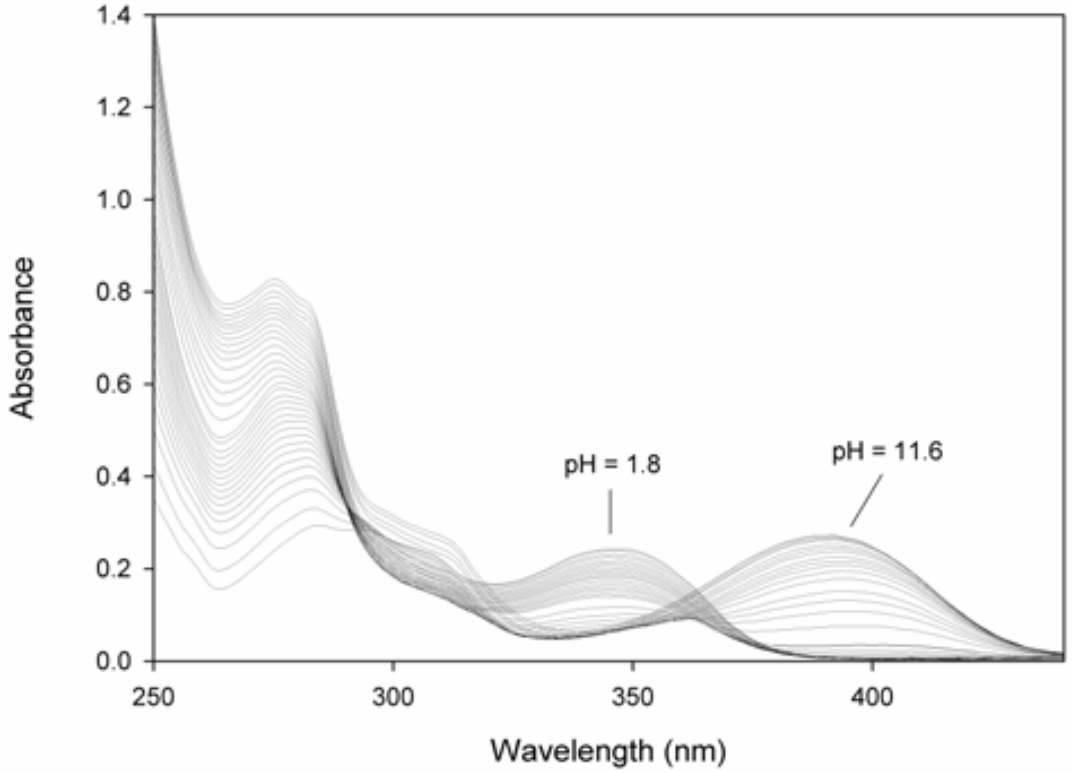


Figura 4.7. Espectres UV-vis obtinguts al llarg de la valoració àcid-base del lligand **HBTI**

Taula 4.3. Constants d'acidesa dels lligands **HBXI**, **HBTI, BMI** i HCQ, i constants de formació dels seus complexos amb Cu(II) i Zn(II) determinades per mesures espectrofotomètriques en un medi 50% etanol:aigua, I = 0.10 M NaCl i T = 37ºC (desviació estàndard associada a la darrera xifra). Valors de pM (-log[M]$_{lliure}$ on M = Cu(II) (pH = 6.6) i Zn(II) (pH = 7.4) per a solucions amb [M]$_{tot}$ = 25 μM i [lligand]$_{tot}$ = 50 μM)

	Ligand [a]		Cu(II) [b]			Zn(II) [b]		
	pKa$_1$	pKa$_2$	log β$_1$	log β$_2$	pCu	log β$_1$	log β$_2$	pZn
HBXI	[c]	9.978 (9)	14.444 (9)	23.06 (7)	11.06	13.55 (8)	22.25 (9)	10.98
HBTI	[c]	8.11 (1)	12.049 (9)	20.29 (2)	10.52	11.68 (1)	19.68 (4)	10.91
BMI	3.650 (2)	7.440 (8)	10.347 (9)	19.19 (2)	9.46	10.87 (7)	18.53 (7)	10.55
HCQ	1.94 (5)	8.300 (2)	12.48 (4)	21.91 (3)	10.77	12.141 (8)	20.23 (1)	11.22

[a] Les constants d'acidesa corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $H_2L \leftrightarrows HL + H$ (p*Ka*$_1$); $HL \leftrightarrows L + H$ (p*Ka*$_2$).
[b] Les constants de formació corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $M(II) + L \leftrightarrows ML$ (log β_1); $M(II) + 2L \leftrightarrows ML_2$ (log β_2).
[c] El valor de pKa$_1$ és massa baix per ser determinat en l'interval de pH estudiat.

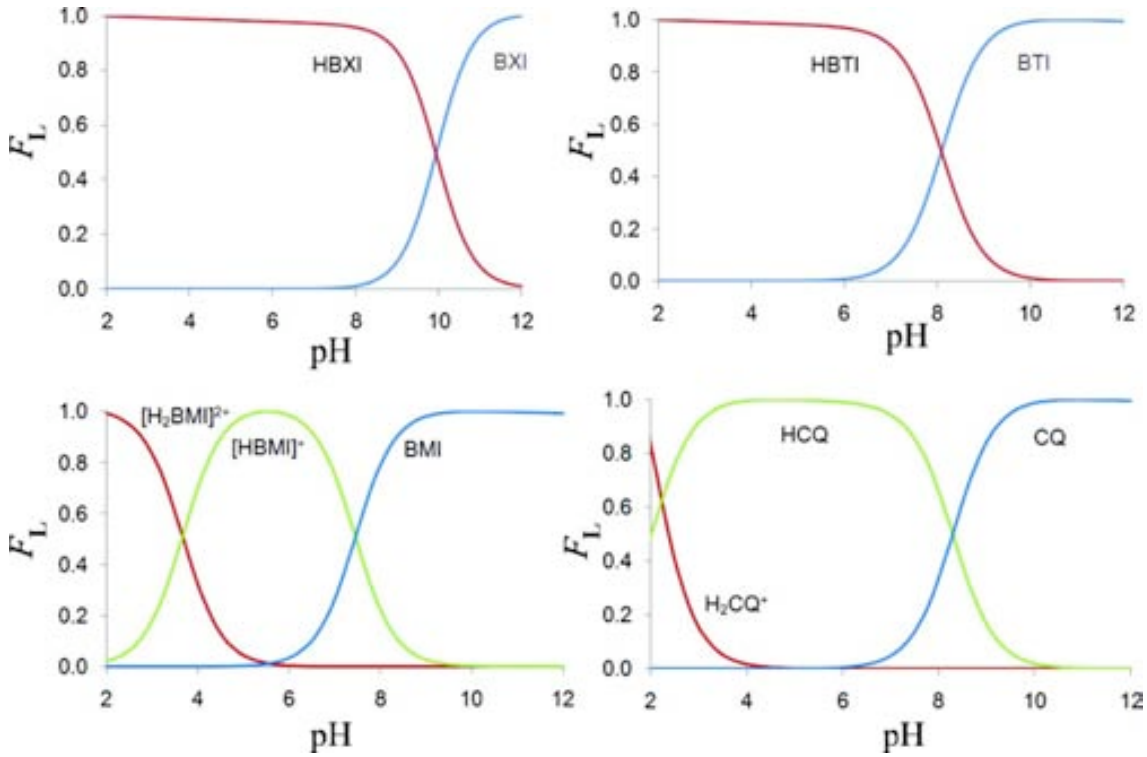


Figura 4.8. Diagrama d'especiació per als lligands **HBXI**, **HBTI, BMI** i HCQ. F_L correspon a la fracció del lligand. Concentracions totals: [**HBXI**] = [**HBTI**] = [**BMI**] = 0.024 mM; [HCQ] = 0.12 mM

4.4. Síntesi i caracterització dels complexos ML_2 (M = Zn(II) i Cu(II) i L = BXI, BTI i BMI)

Els complexos dels lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI** amb Cu(II) i Zn(II), han estat preparats barrejant el corresponent clorur MCl_2 amb cadascun dels lligands. En totes les reaccions, es forma un sòlid marronós, per als complexos que es sintetitzen amb Cu(II), o groc, per als de Zn(II), que s'aïllen de la solució per filtració. El complex obtingut en tots els casos, independentment de la relació M:L (1:1 o 1:2) emprada, ha estat ML_2. Els diferents assajos realitzats amb cadascun dels complexos obtinguts amb la finalitat d'obtenir monocristalls adequats per difracció de raigs X han estat infructuosos. Els detalls experimentals així com la caracterització dels complexos obtinguts es troba a l'apartat de *Procediments experimentals i Tècniques utilitzades.*

Pel que fa a la nuclearitat dels complexos, a la bibliografia s'han descrit estructures cristal·lines d'espècies mononuclears i dinuclears de complexos ZnL_2 amb lligands molt propers a **HBXI** i **HBTI**. En aquestes espècies la geometria de coordinació al voltant del Zn(II) és tetraèdrica quan presenta mononuclearitat i bipiràmide trigonal distorsionada quan es tracta del complex dinuclear. No obstant, com es veurà més endavant, els estudis en solució per

determinar les constants de formació dels complexos d'aquests lligands amb Zn(II), són consistents amb la formació exclusiva d'espècies mononuclears ZnL i ZnL_2. En el cas dels complexos de Cu(II), bibliografia de compostos semblants als que es presenten en aquest treball no aporten evidències sobre l'existència de compostos dinuclears. Addicionalment, aquest fet es corrobora en el nostres treball mitjançant tècniques de ressonància paramagnètica electrònica (EPR), espectrometria de masses i estudis en solució.

4.4.1. Caracterització dels complexos de Cu(II) per EPR

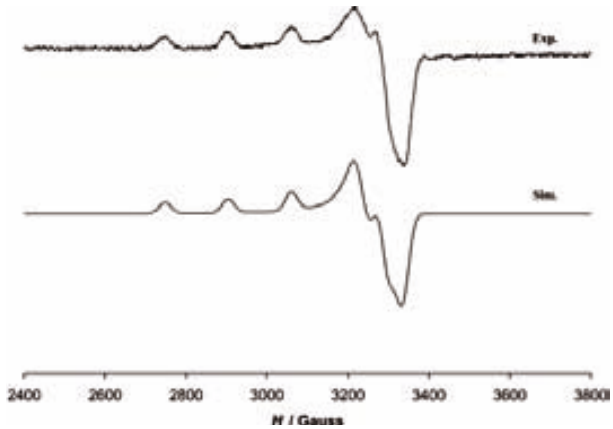
L'espectre de EPR en banda X del complexos **$[Cu(BXI)_2]$, $[Cu(BTI)_2]$ i $[Cu(BMI)_2]^{2+}$** en dissolució congelada (150K, 1:1 diclorometà/toluè per **$[Cu(BXI)_2]$, $[Cu(BTI)_2]$** i etanol/metanol per **$[Cu(BMI)_2]^{2+}$**) presenten un perfil molt semblant (Figura 4.9). Aquest mostra un acoblament hiperfí del $^{63,65}Cu$ en la regió g_{zz} i els paràmetres g són g_{xx} , $g_{yy} \cong 2.05$ i $g_{zz} = 2.25$ (Figura 4.9b). El valor de la constant d'acoblament hiperfí observada per a aquests complexos, A_{zz}, equival a una geometria de coordinació al voltant de l'ió Cu(II) essencialment plana.[204] La magnitud dels paràmetres A_{zz} i g_{zz} depèn de la naturalesa dels lligands coordinats a l'ió Cu(II) i s'utilitzen per assignar quina estructura presenta el complex. Per als complexos CuL_2 amb els lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI** s'observa un decreixement del paràmetre A_{zz} quan s'incrementa g_{zz}, la qual cosa indica una geometria de coordinació al voltant del Cu(II) plano quadrada amb distorsió tetraèdrica. A fi de quantificar el grau de distorsió d'aquests complexos s'ha calculat la relació $f=g_{zz}/A_{zz}$ obtingut per a cadascun dels espectres i s'han obtingut valors al voltant de 150 cm. Per compostos plano-quadrats el paràmetre f està comprès entre 105 i 135 cm.[205,206] En base a aquest paràmetre es pot concloure que la geometria de coordinació al voltant del Cu(II) en els complexos **$[Cu(BXI)_2]$**, **$[Cu(BTI)_2]$** i **$[Cu(BMI)_2]^{2+}$** és plano-quadrada amb distorsió tetraèdrica.

4.4.2 Estudi de l'estructura 3D dels complexos ML_2 per càlculs DFT (M = Cu(II) i Zn(II); L = BXI, BTI i BMI)

D'acord amb els càlculs DFT es demostra que els ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) al coordinar-se amb els lligands estudiats, presenten una preferència coordinativa a través del N de l'anell heterocíclic i el grup OH fenòlic (**HBXI** i **HBTI**) o NH_2 de l'anell anilina (**BMI**).

Amb la finalitat de predir quina geometria de coordinació presentarien els complexos CuL_2 i ZnL_2 s'ha optimitzat la geometria dels complexos energèticament més estables en base a càlculs quàntics B3LYP. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4.10, on es pot observar que l'ió Cu(II) amb aquests lligands dóna lloc a complexos plano-quadrats distorsionats, tal i com s'ha comprovat amb els estudis d'EPR, en canvi l'ió Zn(II) afavoreix la formació de complexos tetraèdrics.

(a)



(b)

compound	g_{zz}	g_{yy}	g_{xx}	A_{zz} (G)	A_{yy} (G)	A_{xx} (G)	f (cm)[b]
[Cu(BXI)$_2$]	2.253	2.080	2.045	156	20	20	155
[Cu(BTI)$_2$]	2.252	2.070	2.040	165	20	10	146
[Cu(BMI)$_2$]$^{2+}$	2.240	2.060	2.020	160	10	10	150

[a] Solvents: 1:1 dichloromethane/toluene for **[Cu(BXI)$_2$]** and **[Cu(BTI)$_2$]** and 1:1 ethanol/methanol for **[Cu(BMI)$_2$]$^{2+}$**. [b] $f = g_{zz}/A_{zz}$; $A(\mathrm{cm}^{-1}) = 0.46686451 \times 10^{-4}|g_z|A(\mathrm{G})$.

Figura 4.9. (a) Espectre EPR teòric i simulat del compost [Cu(BTI)$_2$] en una solució a 150K de 1:1 diclorometà/toluè. (b) Taula on es mostren els paràmetres d'espín Hamiltonià obtinguts per simulació i el factor f (definit en el text)

Donat que en aquest treball es considera que la capacitat intercaladora dels lligands és fonamental, s'ha estudiat si la coordinació dels lligands al centre metàl·lic indueix canvis en els angles de torsió del propi lligand. D'acord amb els càlculs DFT, els lligands **BXI** i **BTI** al coordinar-se a Zn(II) es desvien 1º, i a Cu(II) 3 i 12º respecte l'angle de torsió que presenten quan es troben lliures. En canvi **BMI**, al formar complexos amb Cu(II) o Zn(II), incrementa l'angle de torsió 22 i 23º respectivament. El fet que **BMI** presenti una major desviació de la planaritat respecte **BXI** i **BTI** és degut a que la barrera d'energia associada a la rotació a través de l'enllaç C-C en el cas de **BMI** és la menor dels tres lligands i per tant, el cost energètic que li suposa distorsionar-se per donar lloc a una millor interacció amb els ions metàl·lics és baix. Pel que fa als lligands **BXI** i **BTI**, s'observa que els complexos de Cu(II) presenten major distorsió que els de Zn(II) degut als efectes de repulsió L-L que tenen lloc al formar complexos amb geometria de coordinació plano-quadrada.

Aquest estudi teòric també ha permès obtenir distàncies M-L, les quals poden anticipar per quin metall tenen més tendència a formar complexos els lligands estudiats. Els resultats obtinguts (Figura 4.10) mostren un comportament general: la coordinació a Cu(II), és més favorable que a Zn(II), com es demostrarà mitjançant la determinació de les constants de formació.

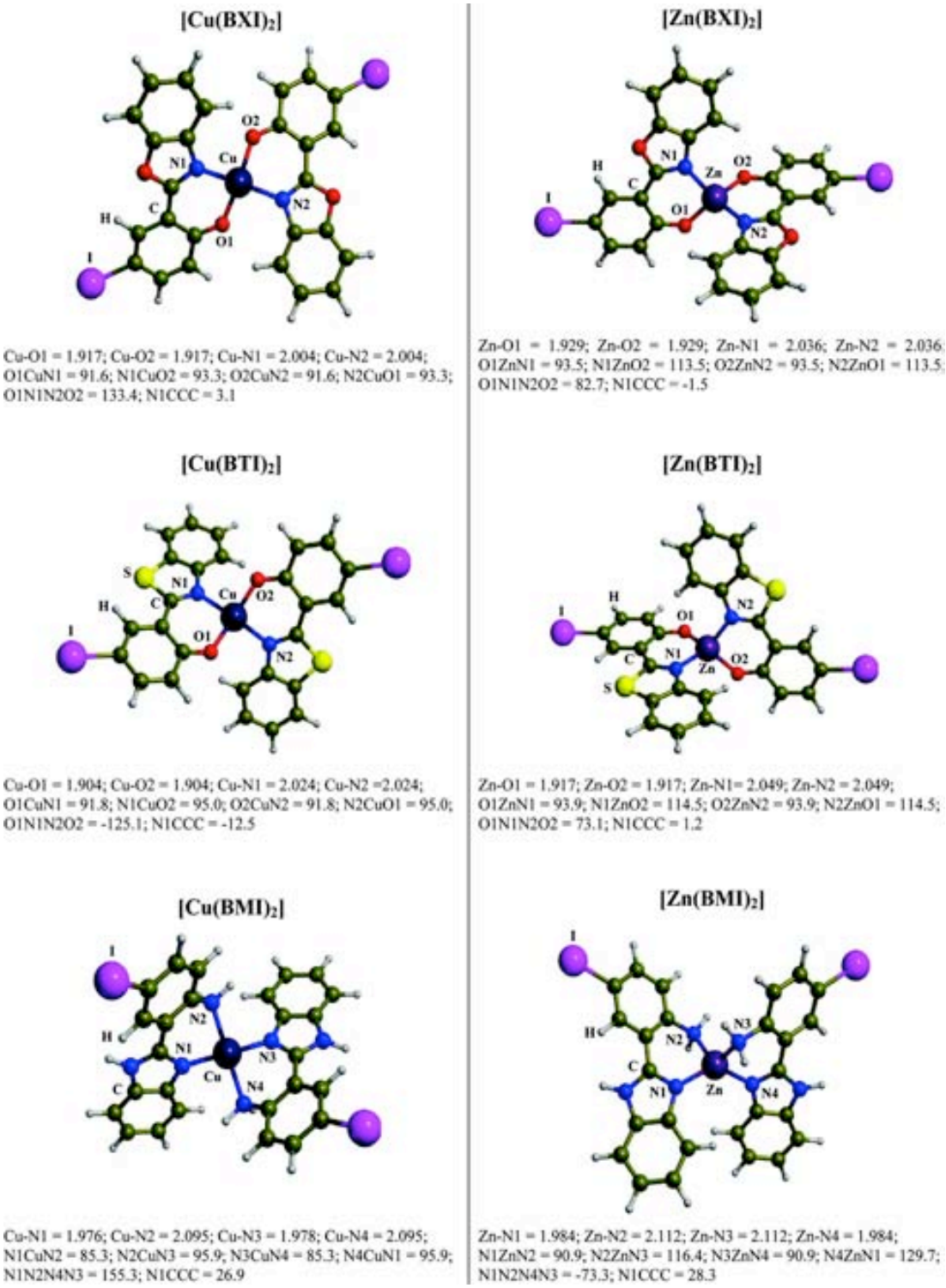


Figura 4.10. Distàncies d'enllaç (Å) i angles (º) seleccionats dels complexos optimitzats en base a càlculs B3LYP

4.4.3. Determinació de les constants de formació dels complexos ML_2

Les valoracions espectrofotomètriques dels lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI** en presència de Cu(II) i Zn(II), s'han dut a terme en condicions properes a medis fisiològics (T = 37ºC i I = 0.10 M NaCl). Per a cada sistema lligand-metall el procediment experimental ha consistit en realitzar una valoració àcid-base d'una solució que conté L i M en una determinada relació de concentracions que es manté constant al llarg de tot l'experiment. A cada punt de la valoració es mesura el valor de pH i s'enregistra l'espectre UV-vis. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.3 i els diagrames d'especiació per al sistema M-L en relació molar 1:2 a la Figura 4.11.

Com predien els càlculs DFT, els valors determinats de log β mostren una major afinitat dels lligands **HBXI, HBTI, BMI** i **HCQ** per Cu(II) que per Zn(II), seguint l'ordre: **HBXI >** HCQ > **HBTI > BMI**.

En els diagrames d'especiació s'observa que la concentració de metall per sobre de pH 4 és pràcticament inexistent, no obstant, s'ha calculat la concentració de Cu(II) i Zn(II) lliure en solució a pH 6.6 i 7.4, respectivament, per predir la facilitat d'aquests lligands per segrestar els ions Cu(II) i Zn(II) enllaçats al pèptid Aβ. Aquesta concentració es dóna en pM = -log $[M_{lliure}]$ i s'indica a la taula 4.3. En base a aquests valors de pM i considerant que les constants d'afinitat Aβ-Cu(II)[207,208] i Aβ-Zn(II)[209] són de l'ordre nanomolar i micromolar respectivament, podríem concloure que els lligands **HBXI** i **HBTI**, atès que presenten constants de formació amb Cu(II) i Zn(II) altes, tindrien la capacitat de segrestar els ions metàl·lics coordinats pel pèptid Aβ en solució.

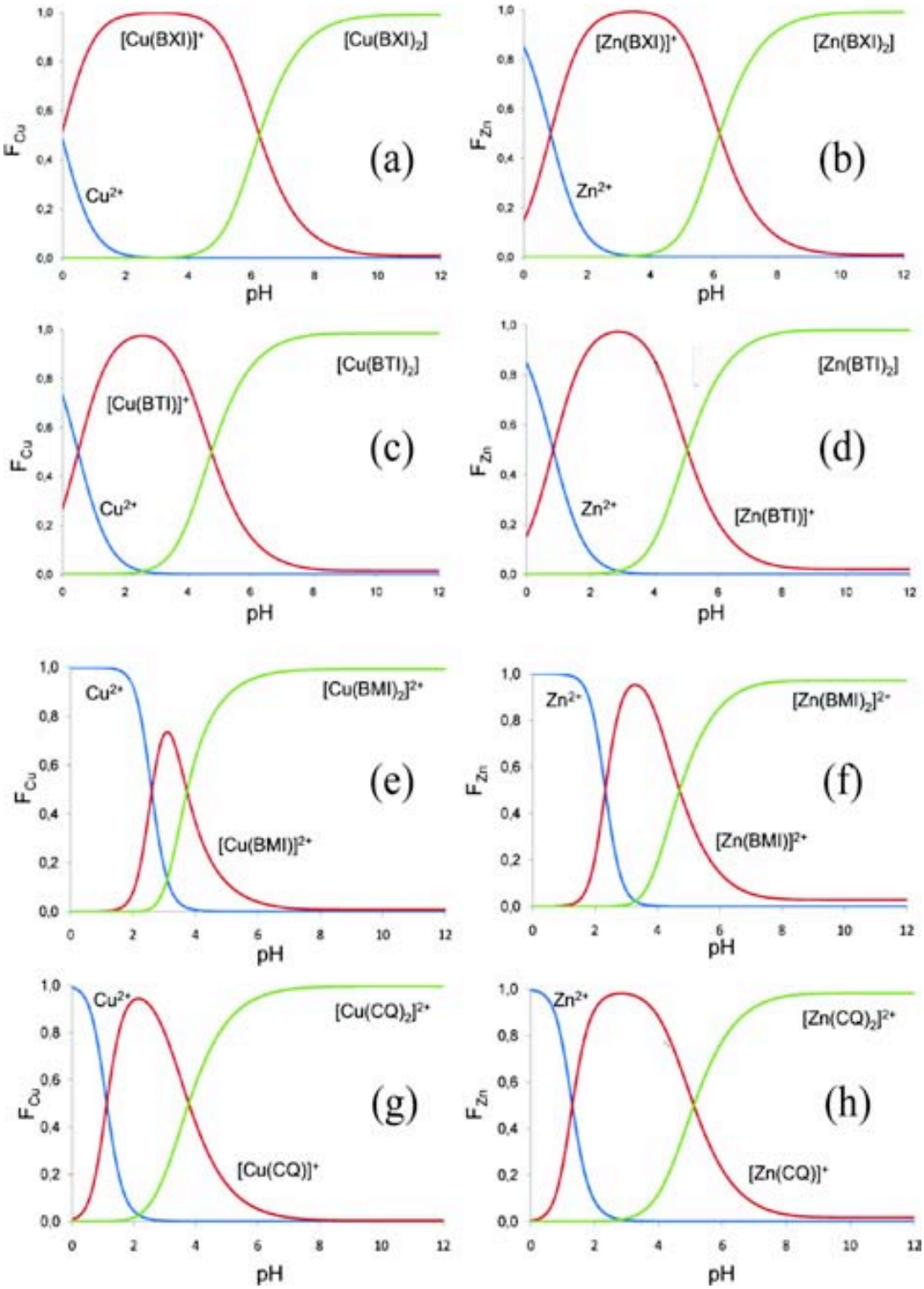
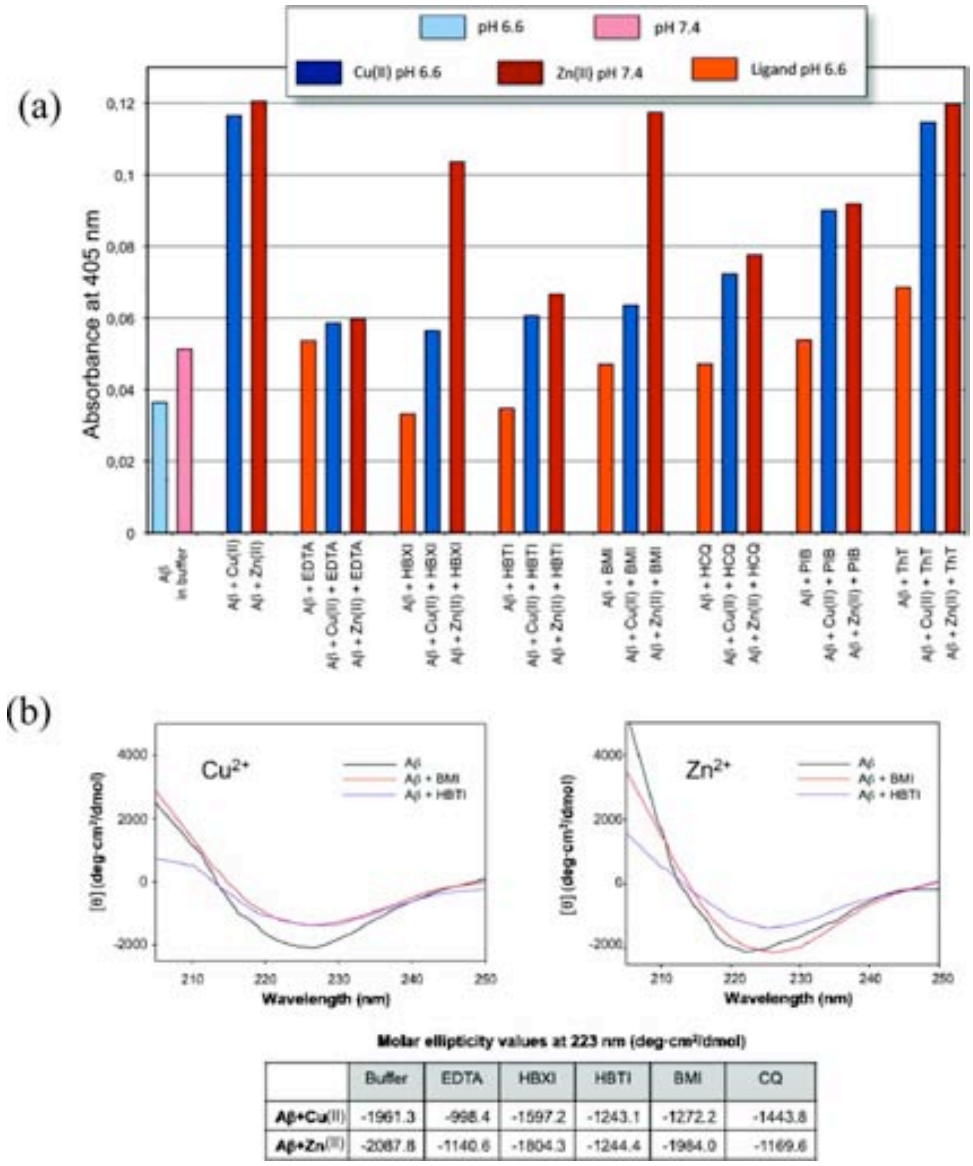


Figura 4.11. Diagrames d'especiació per a: (a) **HBXI** i Cu(II), (b) **HBXI** i Zn(II), (c) **HBTI** i Cu(II), (d) **HBTI** i Zn(II), (e) **BMI** i Cu(II), (f) **BMI** i Zn(II), (g) HCQ i Cu(II) i (h) HCQ I Zn(II); ([Ligand] / [M(II)] = 2, $[M(II)]_{tot}$= 25 μM).

4.5. Avaluació de la capacitat inhibidora de la formació de fibres Aβ en absència i presència de Cu(II) i Zn(II) dels lligands HBXI, HBTI i BMI

Un mètode molt emprat per quantificar l'agregació en sistemes biològics és la turbidimetria. Aquesta tècnica, que requereix un espectrofotòmetre UV-vis, es basa en mesurar la disminució de la llum transmesa a través d'una mostra a causa de les pèrdues de dispersió en incidir sobre partícules en suspensió. Normalment la longitud d'ona de la radiació amb la qual es treballa està compresa dins l'interval 350 – 450 nm. En aquest treball, les mesures de turbidimetria ens han ajudat a avaluar l'habilitat dels tres lligands escollits com a inhibidors de la formació de fibres en absència i en presència de metalls.

Els resultats obtinguts en aquests experiments es mostren a la Figura 4.12 de la qual es poden extreure les següents conclusions: (1) la presència de Cu(II) i Zn(II) en solucions de pèptid $A\beta_{1-40}$ soluble incrementa l'agregació un factor de 3 respecte a l'agregació observada en absència d'aquests ions metàl·lics; (2) en els assajos realitzats amb EDTA s'observa, en presència de metalls, que l'agregació es veu notablement disminuïda, en canvi aquest agent quelant com a inhibidor no dóna uns resultats molt esperançadors; i (3) els compostos **HBXI**, **HBTI** i **BMI** actuen com a inhibidors de l'agregació de pèptid Aβ en absència de metalls. Aquests mateixos lligands, en presència de Cu(II), disminueixen clarament la formació de fibres seguint el següent ordre: **HBXI** > **HBTI** > **BMI**, el qual és paral·lel a la seva capacitat coordinant. Cal remarcar que en presència de Zn(II), l'únic lligand que presenta característiques inhibidores és el **HBTI**, millorant inclús el comportament del HCQ; (4) en presència de metalls, el compost ThT no presenta cap efecte, mentre que la molècula PIB, tot i no ser un agent quelant, mostra una lleugera disminució de l'agregació. Per ambdós compostos, no s'observen efectes positius en la capacitat d'inhibir la formació de fibres en absència de metalls.



	Buffer	EDTA	HBXI	HBTI	BMI	CQ
Aβ+Cu(II)	-1961.3	-998.4	-1597.2	-1243.1	-1272.2	-1443.8
Aβ+Zn(II)	-2087.8	-1140.6	-1804.3	-1244.4	-1984.0	-1169.6

Figura 4.12. (a) Assajos de turbidimetria per avaluar la inhibició de l'agregació del pèptid Aβ_{1-40}. L'absorbància s'ha mesurat a 405 nm. Els lligands proposats han estat comparats amb EDTA i CQ com a agents quelants de referència i ThT i PIB com a agents intercaladors (b) Espectres de CD del pèptid Aβ_{1-40} (25 μM) en presència de Cu(II) i Zn(II) i els compostos indicats. La taula mostra els valors d'el·lipticitat molar observades a 223 nm.

Quan s'utilitza la turbidimetria com a mètode per quantificar el procés de fibril·logènesi s'ha de tenir en compte que aquesta tècnica no proporciona ni informació estructural ni informació sobre els oligòmers petits formats en estadis previs a la fibril·lació. A més, cal remarcar que normalment les mostres no són homogènies, com seria desitjable per a una mesura correcta i poden coexistir agregats fibril·lars conjuntament amb estructures amorfes, les quals també contribueixen a la dispersió total. Per aquest motiu, cal combinar-la sempre amb altres tècniques que donen informació sobre la presència d'estructures tipus fulla β, com és el dicroïsme circular (CD). Els espectres de CD del pèptid Aβ_{1-40} en presència de Cu(II) i Zn(II) mostren una banda negativa a 223-225 nm característica d'estructura secundària tipus fulla β

que indica indirectament que el pèptid està en conformació fibril·lar. Totes les mesures de CD realitzades amb el pèptid $A\beta_{1-40}$ en presència de metalls i lligands es correlacionen bé amb els resultats obtinguts per turbidimetria (Figura 4.12b).

En conjunt, les dades experimentals obtingudes en ambdós experiments per avaluar la capacitat inhibidora de la formació de fibres permeten concloure que en presència de Cu(II) i Zn(II), el lligand **HBTI** disminueix l'agregació del pèptid $A\beta_{1-40}$. Pel contrari, els lligands **HBXI** i **BMI**, únicament són eficients quan és l'ió Cu(II) el responsable de l'agregació. L'observació d'aquest fet podria suggerir que els agents quelants proposats en el present treball presenten una alta especificitat per als ions Cu(II), els quals indueixen l'agregació del pèptid Aβ i alhora generen espècies neurotòxiques ROS.

4.6. Avaluació de la capacitat intercaladora dels lligands HBXI, HBTI i BMI en fibres amiloides

La formació de fibres amiloides és un tret característic de moltes proteïnes. Per avaluar la capacitat intercaladora dels 3 lligands seleccionats per aquest treball, aquests s'han assajat amb fibres formades de pèptid $A\beta_{1-42}$, IAPP i TTR. La IAPP, de l'anglès *Islet amyloid polypeptide*, també coneguda com amilina, és una proteïna de 37 residus que forma agregats amiloides en el pàncrees i que està implicada en la diabetis tipus II. La transtirretina (TTR), també coneguda com a prealbúmina, és una proteïna de 80 aminoàcids que en la seva forma patogènica es diposita en òrgans perifèrics vitals com ara el fetge i el cor.

Les propietats fotoluminiscents que presenten els lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI**, ens han permès realitzar aquests estudis mitjançant mesures de fluorescència i posteriorment, microscòpia de fluorescència. Les primeres mesures de fluorescència es van realitzar amb fibres prèviament formades de TTR i IAPP. Un cop incubades a 37°C amb els lligands, es van enregistrar els espectres de fluorescència excitant a la longitud d'ona característica de cada compost. Independentment de la proteïna precursora de les fibres, s'observa un canvi en la intensitat i el desplaçament de la banda d'emissió per als compostos **HBX** i **HBT**, contràriament el lligand **BM** no produeix cap efecte. Un comportament comparable s'observa per als lligands iodats. (Figura S5 article 1 - *Annex* -)

Els estudis de microscòpia de fluorescència es van dur a terme amb fibres del pèptid $A\beta_{1-42,}$ i IAPP incubades amb els lligands **HBX**, **HBXI**, **HBT**, **HBTI**, **BM** i **BMI**, i a mode de comparació els compostos de referència ThT i PIB. Els resultats es mostren a la Figura 4.13a en forma de taula on s'indiquen les intensitats relatives de fluorescència, a la Figura 4.13b s'observa que les àrees riques en fibres en aquelles mostres incubades amb els compostos **HBX**, **HBXI**, **HBT, HBTI**, ThT i PIB presenten fluorescència. La major intensitat de fluorescència s'observa

amb els lligands **HBX** i **HBT**, aquesta mesura pot indicar un cert grau d'especificitat en unir-se a les fibres. D'acord amb els resultats obtinguts, la fluorescència que emeten els lligands **HBX** i **HBT** milloren les característiques del compost PIB, actualment utilitzat en proves clíniques, mentre que únicament el lligand **HBX** millora al compost ThT.

Addicionalment, les excel·lents propietats intercaladores demostrades amb els lligands iodats **HBXI** i **HBTI**, suggereixen proposar aquests lligands com a possibles ^{123}I-biomarcadors per al diagnòstic *in vivo* per tècniques tipus SPECT.

(a)

	Amylin	$A\beta_{1-42}$	BSA
ThT	+++	+++	-
HBX	++++	++	-
HBXI	+	++	nd
HBT	+++	+	-
HBTI	+	+	nd
BM	-	-	-
BMI	-	-	nd
PIB	+	+	nd

(b)

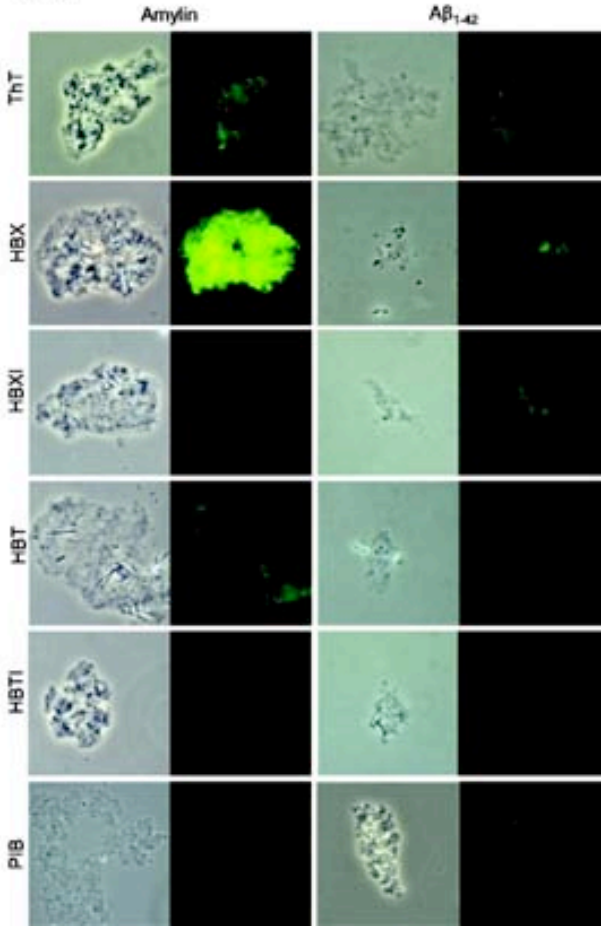


Figura 4.13. (a) Taula d'intensitats relatives de fluorescència. (b) Imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència de fibres incubades amb els lligands **HBX, HBXI, HBT, HBTI**, ThT i PIB

4.6.1. Propietats fluorescents dels lligands HBXI, HBTI i BMI: Transferències protòniques fotoinduïdes

Com s'ha demostrat amb els compostos proposats en aquest treball, la fluorescència atrau un considerable interès degut a les seves aplicacions en camps com la bioquímica i la medicina. Freqüentment, les propietats fotoluminiscents d'una molècula, impliquen reaccions de transferència protònica inter o intramoleculars, conseqüència de la redistribució associada a l'excitació de la molècula. Aquesta redistribució electrònica produeix canvis d'acidesa en els estats excitats, permetent transferències de protons que no es donen en l'estat fonamental. A fi d'interpretar les diferències en els espectres de fluorescència de **HBXI**, **HBTI** i **BMI**, ha estat necessari estudiar teòricament aquestes molècules als estats fonamentals i al primer estat excitat singlet en la transferència protònica.

Les molècules estudiades en aquest treball són molècules neutres heterocícliques constituïdes per dos fragments aromàtics: benzoxazol/fenol (**HBXI**), benzotiazol/fenol (**HBTI**) i benzimidazol/anilina (**BMI**), units mitjançant un enllaç C-C amb possiblitat de rotació i grups funcionals capaços d'establir enllaç d'hidrogen intramolecular (Figura 4.6).
La reacció de transferència protònica per a les molècules **HBXI** i **HBTI** dóna lloc a una tautomeria ceto-enòlica, on la conformació enòlica actua de reactiu i el producte és el tautòmer cetònic que s'obté un cop transferit l'hidrogen fenòlic al N del benzoxazol (**HBXI**) o benzotiazol (**HBTI**). Els treballs experimentals mostren que a l'estat excitat, aquestes molècules, presenten un desplaçament de les bandes d'emissió que demostra la seva tautomerització.

A l'estat fonamental, aquesta redistribució electrònica provoca una pèrdua del caràcter aromàtic en passar del tautòmer enòlic al tautòmer cetònic, la qual cosa es tradueix en que aquest procés sigui energèticament desfavorable donat que resulta una barrera de transferència protònica de 13.0 i 11.5 kcal/mol, per a **HBXI** i **HBTI** respectivament. Aquests valors són prou alts com per impedir la reacció directa de tautomerització. Per tant, tenint en compte això sembla clar que l'única possibilitat d'arribar al tautòmer ceto serà mitjançant l'excitació electrònica de l'enol inicial (Figura S6 – article 1 – *Annex*).
Contràriament, a l'estat excitat la molècula es troba amb una nova topografia de la superfície d'energia potencial. L'excitació estudiada correspon al primer estat excitat singlet on la forma cetònica esdevé més estable (4.8 i 5.4 kcal/mol, **HBXI** i **HBTI** respectivament) que l'enòlica degut a que es genera un guany en aromaticitat, la qual cosa repercuteix en un augment d'acidesa del grup donador del protó i basicitat del grup acceptor.

En conjunt, la transferència protònica que s'estudia té lloc excitant la molècula **HBXI** o **HBTI** en la forma enòlica des de l'estat fonamental a l'estat excitat (forma cetònica). En aquests processos es calcula que la longitud d'ona necessària per produir l'excitació és 468 nm per **HBXI** i 485 nm per a **HBTI**.

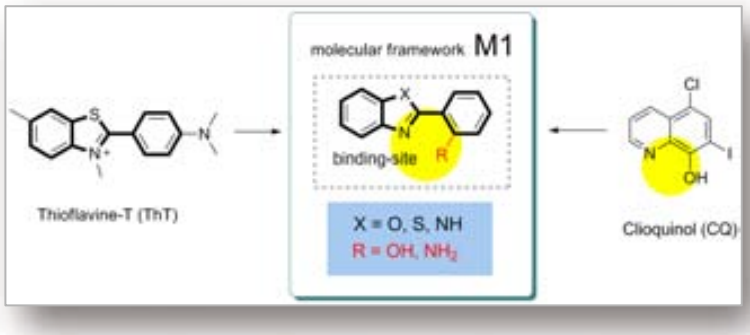
En el cas del lligand **BMI**, es dóna la situació inversa, en l'estat excitat té lloc una redistribució electrònica de la qual resulta un grup imina. Aquesta forma tautomèrica és 1.6 kcal/mol menys estable que l'amina de l'estat fonamental donat que el grup NH_2 no és prou àcid com per afavorir la transferència protònica. En aquest cas, la longitud d'ona necessària és 396 nm.

Els espectres de fluorescència de **HBXI**, **HBTI** i **BMI** presenten un màxim emissió a la longitud d'ona 490, 520 i 415 nm, respectivament. A diferència de **BMI**, els lligands **HBXI** i **HBTI** mostren una banda intensa i un desplaçament d'Stokes en l'espectre de fluorescència, fet que indica que ha tingut lloc la transferència protònica. Aquestes longituds d'ona d'emissió han estat calculades per càlculs quàntics i s'han obtingut valors força propers als observats experimentalment, 468, 485 i 396 nm per a **HBXI**, **HBTI** i **BMI** respectivament.

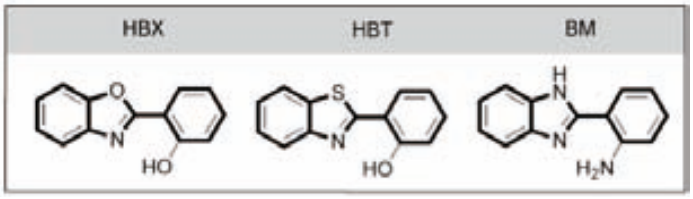
4.7. Conclusions

La incorporació de propietats coordinants a compostos intercaladors, ha demostrat ser una bona estratègia per al disseny de compostos multifuncionals per a la MA. Aquesta estratègia, amb pocs precedents en aquest camp, ha donat lloc a tres compostos amb potencial aplicació per a la diagnosi i la teràpia de la MA. Els resultats del treball multidisciplinar dut a terme permet arribar a les següents conclusions:

1. El disseny de l'esquelet molecular bàsic focalitzant l'atenció en les propietats intercaladores de la molècula i, posteriorment, incorporant fragments que permetin la coordinació als ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II), facilitin la seva iodació i potenciïn les propietats antioxidants del lligand ha estat l'estratègia novedosa d'aquest treball. A fi de construir l'esquelet, ha estat necessari prendre com a referència la molècula més àmpliament utilitzada com a agent de tinció de les plaques senils i que, per tant, mostra gran afinitat per les fibres amiloides: la ThT. Com a resultat d'aquest disseny s'ha obtingut **M1**.



2. La cerca de **M1** en la base de dades emolecules®, ha permès generar 3 quimioteques virtuals. La posterior criba virtual i la selecció dels millors candidats, s'ha dut a terme aplicant successius filtres que descarten aquelles molècules amb poques probabilitats d'èxit per futures aplicacions en medis fisiològics. Com a resultat d'aquest procés s'han obtingut 36 molècules de les quals per simplicitat s'han escollit tres, **HBX**, **HBT** i **BM,** per a realitzar el treball experimental.



3. Amb la finalitat de comprovar si els tres lligands escollits són susceptibles d'incorporar un àtom de iode en la seva estructura per al seu possible ús com a agents de diagnosi, s'han sintetitzat els tres derivats iodats, **HBXI**, **HBTI** i **BMI**, mitjançant mètodes de iodació amb ^{127}I en un sol pas, simples i ràpids freqüentment utilitzats per al marcatge radioactiu amb ^{123}I. En tots els tres casos, s'ha obtingut majoritàriament el derivat iodat orientat en posició *para* respecte el grup OH (**HBXI**, **HBTI**) o NH_2 (**BMI**) amb un alt rendiment. Ha estat possible obtenir cristalls de qualitat adequada per a la difracció de raigs X i per tant, la resolució de les estructures cristal·lines ens han mostrat que els lligands **HBXI i HBTI** són essencialment plans (angle diedre entre els fragments benzoxazol/benzotiazol i l'anell de fenol és 4.6 (2) – **HBXI** - i 5.1 (1)º -**HBTI**-) gràcies a l'existència d'un pont d'hidrogen intramolecular. Per al lligand **BMI** el valor de l'angle diedre és lleugerament superior que en els dos casos anteriors, atribuïble a efectes d'empaquetament cristal·lí provocats per l'existència d'un àtom de iode en l'estructura del compost i a la repulsió que té lloc ntre dos H molt propers (H3 i H13). Exceptuant aquesta diferència, els valors de distàncies i angles obtinguts teòricament per a tots tres lligands són molt propers als observats en les estructures cristal·lines.

4. Els complexos dels lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI** amb Cu(II) i Zn(II), han estat preparats barrejant el corresponent clorur amb cadascun dels lligands. El complex obtingut en tots els casos, independentment de la relació M:L (1:1 o 1:2) emprada, ha estat ML_2. Els estudis en solució per determinar les constants de formació dels complexos d'aquests lligands amb Zn(II) i Cu(II), són consistents amb la formació exclusiva d'espècies mononuclears ML i ML_2.

Pel que fa a la geometria de coordinació, els estudis de ressonància paramagnètica electrònica (EPR) dels complexos CuL_2 evidencien una geometria de coordinació al voltant del Cu(II) plano-quadrada distorsionada la qual es confirma per càlculs DFT. En base als mateixos càlculs, el Zn(II) afavoreix la formació de complexos tetraèdrics.

5. Els estudis espectrofotomètrics per a determinar les constants d'acidesa i la capacitat coordinant envers Cu(II) i Zn(II) s'han realitzat amb els lligands **HBXI**, **HBTI**, **BMI** les condicions experimetals s'han mantingut constants i properes a les condicions fisiològiques (pH 7.4, T = 37ºC i μ = 0.1 M NaCl). Atès que l'agent quelant clioquinol (HCQ) té la capacitat de segrestar els ions metàl·lics en les plaques senils, es compara la capacitat coordinant dels tres lligands **HBXI**, **HBTI**, **BMI** enfront aquest darrer. Amb aquesta finalitat, es determinen les constants d'acidesa del HCQ sota les mateixes condicions. Les dades espectrals obtingudes de la valoració àcid-base per a totes els sistemes avaluats, s'han tractat amb el programa pHab2000. Els valors determinats de log β mostren una major afinitat dels lligands **HBXI, HBTI, BMI** i HCQ per Cu(II) que per Zn(II), si bé en ambdós casos es segueix l'ordre: **HBXI >** HCQ > **HBTI > BMI**. Els valors de les constants de formació obtingudes permeten representar els

diagrames de distribució d'espècies en funció del pH, els quals evidencien que la concentració de metall lliure en solució a pH 6.6 (per al Cu(II)) i 7.4 (per al Zn(II)), és molt baixa. Aquestes concentracions, juntament amb les constants d'afinitat Aβ-Cu(II) i Aβ-Zn(II) indiquen que **HBXI** i **HBTI**, poden segrestar els ions metàl·lics coordinats pel pèptid Aβ en solució.

	Ligand [a]		Cu(II) [b]			Zn(II) [b]		
	pKa_1	pKa_2	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	pCu	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	pZn
HBXI	[c]	9.978 (9)	14.444 (9)	23.06 (7)	11.06	13.55 (8)	22.25 (9)	10.98
HBTI	[c]	8.11 (1)	12.049 (9)	20.29 (2)	10.52	11.68 (1)	19.68 (4)	10.91
BMI	3.650 (2)	7.440 (8)	10.347 (9)	19.19 (2)	9.46	10.87 (7)	18.53 (7)	10.55
HCQ	1.94 (5)	8.300 (2)	12.48 (4)	21.91 (3)	10.77	12.141 (8)	20.23 (1)	11.22

[a] Les constants d'acidesa corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $H_2L \leftrightarrows HL + H$ (pKa_1); $HL \leftrightarrows L + H$ (pKa_2).

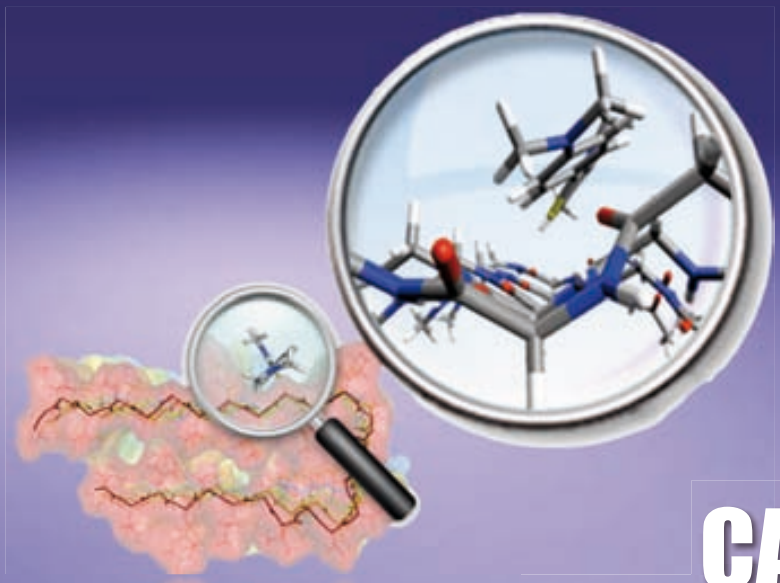
[b] Les constants de formació corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $M(II) + L \leftrightarrows ML$ ($\log \beta_1$); $M(II) + 2L \leftrightarrows ML_2$ ($\log \beta_2$).

[c] El valor de pKa_1 és massa baix per ser determinat en l'interval de pH

6. Els estudis realitzats amb els lligands **HBXI**, **HBTI** i **BMI** per avaluar la seva capacitat inhibidora de formació de fibres en presència i en absència de metalls mostren: (1) que la presència de Cu(II) i Zn(II) en solucions de pèptid $A\beta_{1-40}$ soluble incrementa l'agregació un factor de 3 respecte a l'agregació observada en absència d'aquests ions metàl·lics (2) els compostos **HBXI**, **HBTI** i **BMI** presenten certs efectes com a inhibidors de l'agregació en absència de metalls. Aquests mateixos lligands, en presència de Cu(II), disminueixen clarament la formació de fibres. Aquest efecte segueix l'ordre: **HBXI** > **HBTI** > **BMI**, equivalent a la seva capacitat coordinant. Cal remarcar que en presència de Zn(II), l'únic lligand d'aquest treball que presenta característiques inhibidores és el **HBTI**, millorant inclús el comportament del HCQ.

7. Els estudis de microscòpia de fluorescència duts a terme amb fibres del pèptid $A\beta_{1-42,}$ i amilina incubades amb els lligands **HBX, HBXI, HBT, HBTI, BM** i **BMI,** han demostrat: (1) que els millors resultats d'intercalació s'obtenen amb els lligands **HBX** i **HBT**, millorant inclús les característiques del compost PIB, un radiotraçador encara en proves clíniques que s'enllaça a les plaques senils *in vivo*; (2) cal remarcar que el lligand **HBX** millora les propietats intercaladores de la ThT.

Respecte als compostos iodats, les bones propietats intercaladores que mostren els lligands **HBXI** i **HBTI**, permeten proposar aquests compostos com a possibles ^{123}I-radiotraçadors per al diagnòstic *in vivo* per tècniques tipus SPECT.



CAPÍTOL 5

Interacció del catió ThT^+ amb les fibres amiloides: Determinació de l'estructura 3D del catió ThT^+ i l'estudi de la seva posició, orientació i energia en les fibres $A\beta_{1\text{-}42}$

El principal objectiu d'aquesta tesi ha consistit en dissenyar, seleccionar i caracteritzar agents quelants multifuncionals amb possibles aplicacions per a la MA. El punt de partida per construir l'esquelet molecular dels lligands s'ha inspirat en la ThT, l'agent de tinció més utilitzat per identificar fibres amiloides. Com s'ha vist en el capítol anterior, aquesta estratègia ha permès assegurar la interacció de les molècules proposades amb el pèptid Aβ i, alhora, segrestar els centres metàl·lics (Zn(II) i Cu(II)) presents en les estructures tipus fulla β que forma l'esmentat pèptid.

Si bé la ThT ha estat un referent i ha inspirat el disseny d'un gran nombre de traçadors en el camp de la diagnosi, encara avui es desconeix com interacciona a nivell molecular el seu catió amb les fibres amiloides. Aquest fet, juntament amb la inexistència de l'estructura cristal·lina d'aquest compost, que correspon al clorur del catió ThT^+, van cridar la nostra atenció.

Atès que un dels reptes actuals dins del camp de la MA és el de trobar agents de diagnosi que presentin especificitat per les fibres Aβ, cal disposar d'un coneixement acurat sobre els llocs d'unió, l'orientació i les interaccions que estableix el catió ThT^+ a l'enllaçar-se a les fibres i poder establir quin fragment de la molècula caldria modificar per millorar l'afinitat i l'especificitat. A fi de contribuir en aquest coneixement, s'ha determinat l'estructura cristal·lina del catió ThT^+ i s'han realitzat estudis teòrics per determinar la posició i l'orientació més probables que estableix el catió ThT^+ en el sí de les fibres Aβ així com les interaccions que regeixen el procés d'incorporació.

5.1. Aspectes generals de la ThT i de la seva interacció amb les fibres

Les malalties amiloidogèniques estan relacionades amb l'agregació d'una proteïna o fragment que, com a resultat, forma dipòsits amiloides. Aquests agregats insolubles, independentment de la proteïna implicada en el procés, tenen moltes característiques en comú: (1) presenten resistència a les proteases; (2) majoritàriament, contenen estructura secundària tipus fulla β i (3) Poden ser identificats utilitzant agents de tinció com són el CR o la ThT, que a l'unir-se a les fibres mostren un comportament òptic específic.

La ThT és una sonda fluorescent tradicionalment emprada per a la detecció de plaques amiloides en teixits afectats per malalties amiloidogèniques. Comercialment és el clorur d'un catió, ThT^+, que en ser excitat a una longitud d'ona de 350 nm emet fluorescència a 415 nm aproximadament. En presència de fibres amiloides, els seus espectres d'excitació i emissió es desplacen cap a longituds d'ona més grans (cap al vermell), concretament a 450 i 482 nm respectivament, observant-se un augment en la intensitat de banda.

La fòrmula desenvolupada del catió ThT^+ està formada per dos fragments aromàtics units per un enllaç C-C: (a) un fragment benzotiazol que inclou un grup metil enllaçat al N heterocíclic, generant així una càrrega positiva en l'estructura; i (b) un fragment dimetilanilina. La rotació al voltant de l'enllaç C-C, defineix l'angle diedre φ que, com s'ha demostrat en diversos treballs teòrics,[55-57] determina les propietats òptiques d'aquesta molècula. A la Figura 5.1, s'observa l'estructura del catió ThT^+ que inclou les dimensions moleculars obtingudes en el present treball mitjançant dades de difracció de raigs X, així com l'angle φ que defineixen els dos fragments que formen el catió.

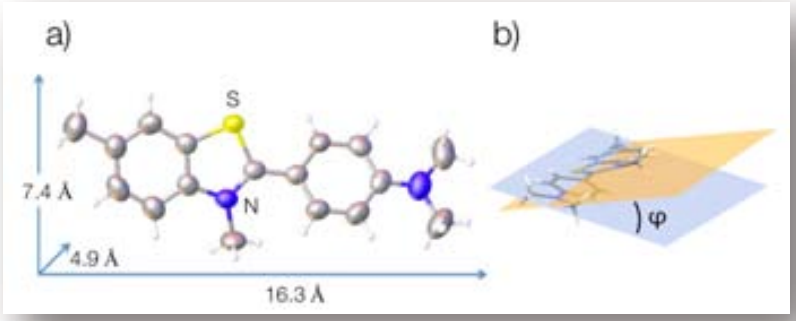


Figura 5.1. (a) Representació el·lipsoidal (50% de probabilitat) del catió ThT^+, on s'indiquen les dimensions moleculars obtingudes en base als radis de van der Waals (b) Angle diedre φ entre els dos fragments plans que donen lloc al catió.

Tal com s'ha comentat, en la bibliografia són escassos els treballs que expliquen quines interaccions, quina disposició, quins llocs d'unió estableix el catió ThT^+ amb les fibres amiloides i per quin mecanisme té lloc l'augment la fluorescència del complex format per la ThT^+ i el pèptid Aβ. La resposta a aquestes preguntes ajudaria a dissenyar noves molècules que interaccionessin específicament amb el pèptid Aβ i en conseqüència, facilitaria la cerca de nous agents terapèutics i de diagnosi per a la MA. A continuació s'exposa un resum dels treballs més rellevants que intenten respondre alguna de les preguntes anteriors en base a diferents aproximacions.

El primer treball que va aportar informació sobre la disposició del catió ThT^+ en les fibres amiloides, es basa en dades experimentals de microscòpia confocal, i estableix que les fibres amiloides són estructures ordenades al llarg de l'espai, les quals s'organitzen deixant uns canals amples (6.5 – 6.95 Å) on el catió ThT^+ es confina bé.[58] En aquest model proposat per Krebs i col·laboradors, consideren el catió ThT^+ com una molècula totalment plana i determinen les seves dimensions moleculars (15.2 x 6.1 x 4.3 Å) en base a programes informàtics genèrics que permeten dibuixar estructures químiques (ChemDraw i CS Chem 3D Std.). Si bé semblaria més adient utilitzar les dimensions moleculars obtingudes a partir de les dades cristal·logràfiques del catió ThT^+, durant la realització d'aquesta tesi una cerca a la base de dades cristal·logràfica *CSD* va demostrar la inexistència de tal estructura.

Posteriorment a aquests estudis de Krebs i col·laboradors, s'ha proposat que els cations ThT^+ s'uneixen a qualsevol proteïna, rica o no en estructura secundària tipus fulla β, sempre i quan hi hagi cavitats amb un diàmetre comprès entre 8 i 9 Å capaces d'allotjar parells de cations ThT^+. Aquest model realitzat en base a estudis teòrics de modelització molecular, dades experimentals de fluorescència i valoracions calorimètriques isotèrmiques proposa que l'augment de fluorescència que acompanya la interacció de la ThT^+ amb certes proteïnes i/o pèptids és deguda a la formació d'un excímer.[52]

Contràriament al que proposen en aquest darrer treball, recentment s'ha descrit l'única estructura cristal·lina del catió ThT^+ enllaçat a una proteïna: l'acetilcolinesterasa del peix *Torpedo Californica* (*tc*AchE).[59] Aquestes dades de difracció de raigs X evidencien l'existència d'un sol catió ThT^+ confinat en una cavitat perifèrica (P-site) de la *tc*AchE. Aquesta unió incrementa 1000 vegades la fluorescència que presenta el catió ThT^+ lliure. Malgrat aquesta proteïna no conté majoritàriament estructura secundària tipus fulla β no deixa de ser un bon i únic punt de partida per observar amb quins residus aminoacídics interacciona i quina disposició adopta el ThT^+ en el lloc d'unió.

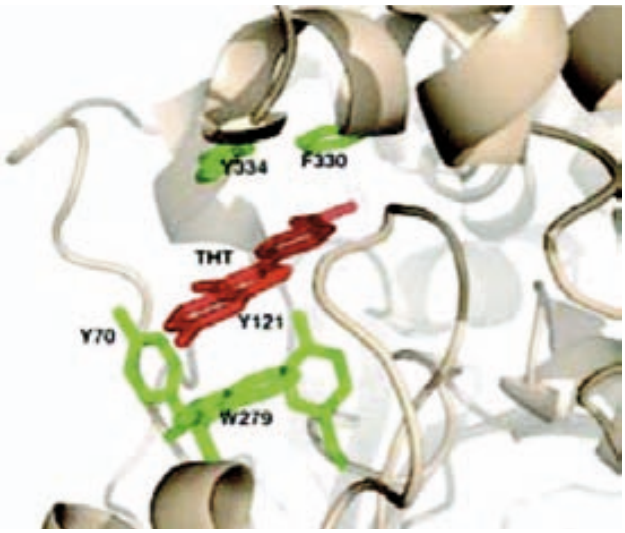


Figura 5.2 ThT^+ confinat en la cavitat perifèrica (P-site) de la *tc*AchE. Els residus aromàtics que estableixen interaccions tipus π amb la ThT^+ són el Trp279, la Tyr334 i la Phe330.

Els principals aminoàcids aromàtics que interaccionen amb el catió ThT^+ són el Trp279, la Tyr334 i la Phe330, els quals estableixen interaccions tipus π amb els fragments benzotiazol i dimetilanilina. Les distàncies observades entre els residus Trp279 i Phe330 i el catió ThT^+ són de l'ordre de 3.6 Å, assignables a interaccions tipus π. L'orientació que adopten els tres aminoàcids aromàtics esmentats respecte el catió ThT^+ dificulta la rotació al voltant de l'enllaç C-C, la qual cosa es tradueix en una disposició coplanar de l'anell benzotiazol i dimetilanilina. Segons estudis teòrics, aquest bloqueig de rotació es tradueix en un augment de fluorescència el que explicaria l'important augment de la fluorescència del catió ThT^+ en unir-se a la *tc*AchE.[56]

Una altra de les contribucions recents en aquest camp s'ha basat en mètodes teòrics i tècniques computacionals per a modelar el comportament del catió ThT^+ a l'interaccionar amb les fibres Aβ. A fi d'esbrinar quins llocs d'unió presenten més probabilitat per enllaçar al catió ThT^+ han realitzat estudis basats en simulacions de dinàmica molecular amb un model simplificat del pèptid Aβ, concretament el heptapèptid $A\beta_{16-22}$. Aquesta metodologia ha permès identificar varis llocs d'unió preferents per al catió ThT^+ a la superfície de la fibra.[210]

Finalment, a fi d'establir quin dels fragments que formen part del catió ThT^+ podria ser el responsable de conferir l'especificitat que es requereix per a poder dissenyar un bon agent de diagnosi o teràpia per a la MA, Faller i col·laboradors, han sintetitzat 18 derivats neutres del catió ThT^+ modificant el fragment dimetilanilina.[178] La determinació de les constants d'afinitat (K_d) d'aquestes molècules envers el pèptid Aβ evidencia que la substitució del grup $-N(Me)_2$ pel

grup –NHMe augmenta el valor de K_d. Aquesta dada els porta a proposar que la possibilitat d'establir enllaços d'hidrogen és l'únic tipus d'interacció que pot incrementar l'afinitat a les fibres, descartant que els enllaços tipus π amb el pèptid Aβ tinguin un paper rellevant.

5.2. Estructura cristal·lina del catió ThT^+

Un dels primers objectius d'aquesta part del treball ha estat examinar l'estructura cristal·lina del catió ThT^+ lliure amb la finalitat d'establir quins tipus d'interaccions regeixen la seva estructura i si aquestes poden ser rellevants quan s'enllaci a les fibres amiloides. A fi d'obtenir cristalls de qualitat adequada per a la difracció de raigs X, s'han realitzat proves de cristal·lització del compost comercial prèviament recristal·litzat en diferents solvents, éssent totes elles infructuoses. Freqüentment, quan això passa, l'estratègia de canviar l'anió per un altre contraió més voluminós ajuda al procés d'obtenció de cristalls. En el nostre cas, d'entre totes les proves realitzades amb diferents anions i dissolvents, els millors resultats obtinguts han estat amb l'anió iodur. Així, el tractament de (ThT)Cl amb NaI en solució aquosa, dóna lloc a un sòlid groc que un cop filtrat i assecat al buit, es dissol en $CHCl_3$ i es deixa evaporar lentament. Al cap de 24 h apareixen uns cristalls vermells que es caracteritzen com a $(ThT)_2I_4{\cdot}2CHCl_3$ **(1).** Separats els cristalls vermells de la solució, si aquesta es continua evaporant, passada una setmana aproximadament, apareixen uns altres cristalls grocs que corresponen a $(ThT)I{\cdot}CHCl_3$ **(2)**. Les cel·les unitat d'**(1)** i **(2)** es mostren a la Figura 5.3, i les principals dades cristal·logràfiques a la Taula 5.1. En la primera estructura el contraió consisteix en un poliiodur (I_4^{2-}), anió molt poc freqüent i probablement la seva formació es pot atribuir a una oxidació parcial de l'anió I^- per contacte amb l'oxigen de l'aire, mentre que en **(2)** l'anió és el I^-. L'existència d'aquestes dues estructures cristal·lines i els anteriors intents infructuosos per cristal·litzar el catió ThT^+ assenyalen la rellevància dels ions iodurs i del dissolvent cloroform en la formació de monocristalls.

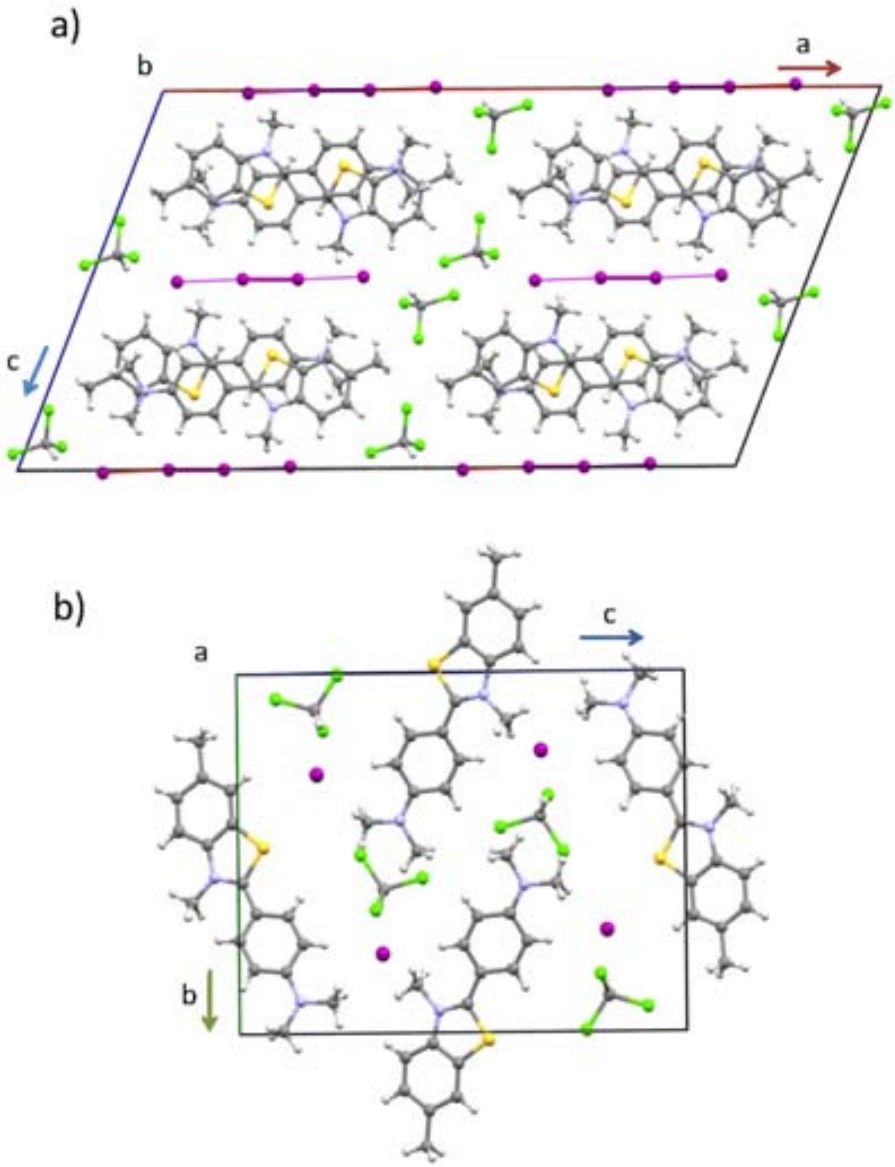


Figura 5.2. Cel·la unitat dels cristalls (a) $(ThT)_2I_4{\cdot}2CHCl_3$ **(1)**, i (b) $(ThT)I{\cdot}CHCl_3$ **(2)**.

Taula 5.1. Dades cristal·logràfiques i paràmetres de refinament de les estructures cristal·lines **(1)** i **(2)**

	1	2
empirical formula	$C_{36}H_{40}Cl_6I_4N_4S_2$	$C_{18}H_{20}Cl_3IN_2S$
formula weight	1313.14	529.67
crystal system	monoclinic	monoclinic
crystal size/mm^3	0.36 x 0.18 x 0.03	0.62 x 0.24 x 0.05
space group	C2/c	$P2_1/n$
crystal color	red	Yellow
a /Å	36.297 (3)	7.4500 (5)
b/Å	7.1666 (5)	14.7704 (9)
c/Å	19.5063 (13)	19.5483 (12)
α/deg	90	90
β/deg	112.525 (1)	94.431 (1)
γ/deg	90	90
V/Å^3	4687.0 (6)	2144.7 (2)
T /K	296 (2)	296 (2)
Z	4	4
ρ_{calcd} /g·cm^{-3}	1.861	1.640
μ (Mo Kα) /mm^{-1}	3.121	1.969
F_{000}	2520	1048
θ_{min}-θ_{max} /deg	1.21 – 29.10	1.73 – 29.01
hkl range	-48/35,-7/9,-26/26	-10/9,-19/18,-22/25
reflections collected	15766	14563
independent reflections (R_{int})	5775 (0.0346)	5255 (0.0356)
observed reflection [I>2σ(I)]	3500	3608
agreement indexes [I>2σ(I)]	R(F) = 0.0524 $R_w(F^2)$ = 0.1233	R(F) = 0.0420 $R_w(F^2)$ = 0.0851
agreement indexes (all data)	R(F) = 0.0968 $R_w(F^2)$ = 0.1431	R(F) = 0.0706 $R_w(F^2)$ = 0.0956
GOF (all data)	1.042	1.005
Largest diff. peak/hole (e/ Å^3)	0.898/-0.672	0.791/-0.432

El catió ThT^+ en **(1)** i **(2)** presenta uns paràmetres geomètrics molt semblants. Així, les dimensions moleculars en base als radis de van der Waals són 16.3 x 7.4 x 4.9 Å per **(1)** (Figura 5.1) i 16.3 x 7.4 x 4.7 Å per **(2)**. La principal diferència entre les dues ThT^+ es troba en l'angle diedre φ, el paràmetre més rellevant i indicatiu del grau de planaritat que presenta el catió ThT^+ dins l'estructura cristal·lina. Per al catió ThT^+ en el compost **(1)** s'obté un valor de 23.8 (2)º , lleugerament superior al trobat en el compost **(2)** (20.0 (2)º).

En totes dues estructures els cations ThT^+ s'apilen formant columnes, on els cations veïns es disposen es disposen en forma cap-i-cua (*head to tail*) a fi de minimitzar les repulsions electroestàtiques entre els grups -NMe^+. Pel que fa als elements de simetria que relacionen els cations successius en cada columna, es troba un eix de rotació C_2 en **(1)**, mentre que en **(2)**

existeix simetria a través d'un centre d'inversió. En ambdues estructures, les distàncies entre els cations apilats successivament permeten proposar la presència d'interaccions π-π, el que mostra la importància de les forces dispersives en l'empaquetament de l'estructura. Així, entre els cations ThT^+ s'observa un solapament Th-Ph (tiazol i dimetilanilina) en **(1)**, i dos solapaments diferents: (a) Th-Th i (b) parcialment entre Bz-Ph (on Bz denota l'anell de benzè unit al tiazol) en **(2)** (Figura 5.3).

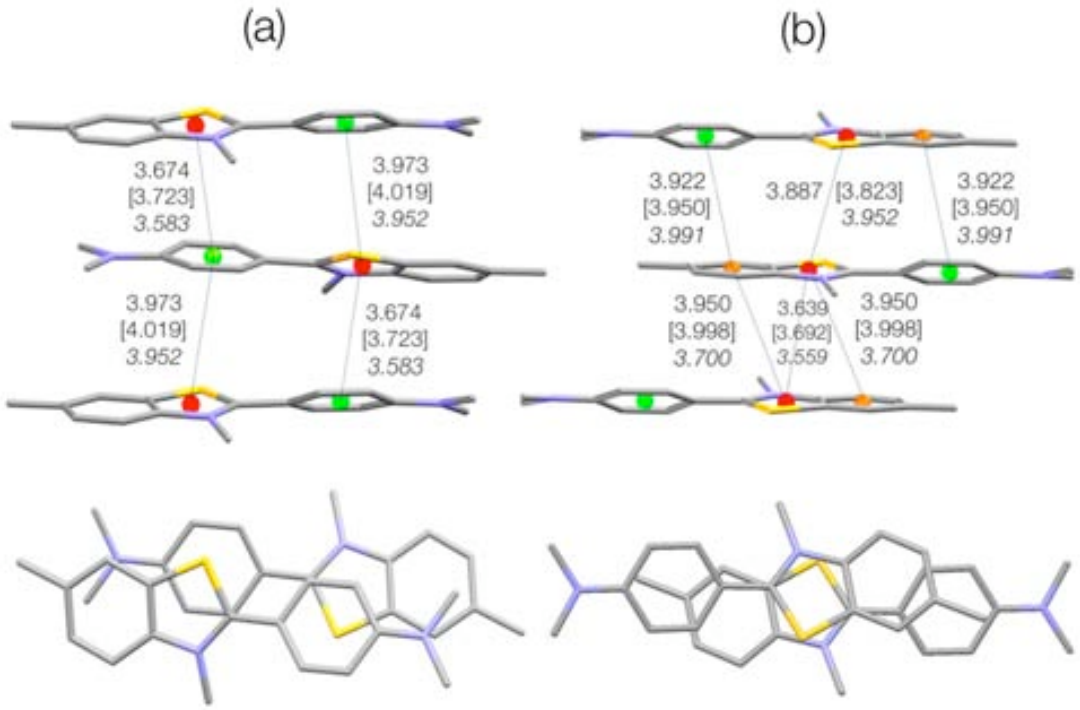


Figura 5.3. Vista lateral i des de dalt de la disposició que adopten els cations ThT^+ en el cristall (a) **1** i (b) **2.** Distàncies entre centroids (Å) obtingudes mitjançant les dades de difracció de raigs X, càlculs periòdics B3LYP [en claudàtors] i càlculs periòdics B3LYP amb correcció de la dispersió (B3LYP-D) en lletra *itàlica*.

A continuació es presenta un resum dels resultats teòrics obtinguts en aquest treball. Aquests han estat realitzats conjuntament pel *Grup d'estudis teòrics d'activació de biomolècules* de la Universitat Autònoma de Barcelona dirigit per la Prof. Mariona Sodupe, el grup especialista en càlculs quàntics periòdics B3LYP[211,212] aplicats a sistemes cristal·lins de la Università degli Studi di Torino dirigit pel Prof. Piero Ugliengo i finalment, el Dr. Hugo Gutiérrez de Terán de la Fundación Pública Galega de Medecina Xenómica expert en tècniques computacionals bioinformàtiques ha estat el responsables dels estudis de *docking* i dinàmica molecular per al sistema ThT^+-$A\beta_{1-42}$.

Amb la finalitat d'estudiar si els valors de φ obtinguts per al catió ThT^+ del cristall **1** i **2** són resultat dels efectes de l'empaquetament del cristall, o pel contrari són deguts a les propietats químiques intrínseques del ThT^+, s'han realitzat càlculs quàntics B3LYP en fase gas, per al

catió lliure i s'ha calculat el perfil energètic associat a la rotació a través de l'enllaç C-C (Figura 5.4). El perfil d'energia potencial envers l'angle de torsió que es troba en base a aquests càlculs, indica que el valor de φ de mínima energia per al catió en fase gas és 35º, el qual és significativament major que els valors de φ trobats en els cristalls **1** i **2**. La raó d'aquesta diferència d'angle φ s'atribueix a que per al catió ThT^+ lliure, les interaccions repulsives entre el grup metil enllaçat al nitrogen heterocíclic i l'àtom d'hidrogen més proper de l'anell de dimetilanilina (Figure 5.1) obliguen a una disposició allunyada de la planaritat. Aquest efecte repulsiu és inexistent quan s'elimina el grup metil de l'estructura del ThT^+ i per tant en el compost anàleg corresponent els dos fragments esdevenen coplanars. No obstant, el cost energètic associat a la rotació al voltant de l'enllaç C-C del catió ThT^+ lliure és baix, *ca.* 5 $kcal{\cdot}mol^{-1}$ (Figura 5.4), la qual cosa mostra que la rotació al voltant de l'enllaç C-C, i en conseqüència l'angle φ, estarà modulat per l'entorn al qual estigui exposat el catió ThT^+.

A fi de comprendre quin paper juga l'anió iodur en l'estructura cristal·lina i si aquest provoca que l'angle diedre disminueixi respecte a l'obtingut per al catió ThT^+ lliure, s'han avaluat en base a càlculs quàntics B3LYP en fase gas, dos sistemes simples diferents: (a) (ThT)I i (b) $(ThT)_2I_2$. Els resultats obtinguts en el sistema (ThT)I mostren que l'estructura més estable disposa l'anió iodur al damunt de l'anell tiazol per neutralitzar la càrrega del grup NMe^+ i s'estableix una interacció feble I···HC(Ph), que es tradueix en un augment de l'angle φ de 10º respecte a l'angle diedre que presentava el catió lliure (35º) (Figura 5.5a). En el cas del sistema $(ThT)_2I_2$, ha estat necessari modificar les bases del càlcul B3LYP amb un terme corrector de les forces dispersives (correcció empírica de Grimme) obtenint les bases del càlcul B3LYP-D.[213] Aquest terme és imprescindible utilitzar-ho en sistemes on existeixen anells aromàtics que interaccionen entre ells mitjançant interaccions π. Els resultats obtinguts per aquest darrer sistema en base a càlculs B3LYP-D fan que l'angle φ esdevingui un altre cop 35º (Figura 5.5b). En conjunt, aquests càlculs permeten concloure que la conformació final del catió ThT^+ i per tant el valor de l'angle φ és el resultat d'un delicat balanç entre les forces electrostàtiques i dispersives que tenen lloc en sistemes aromàtics.

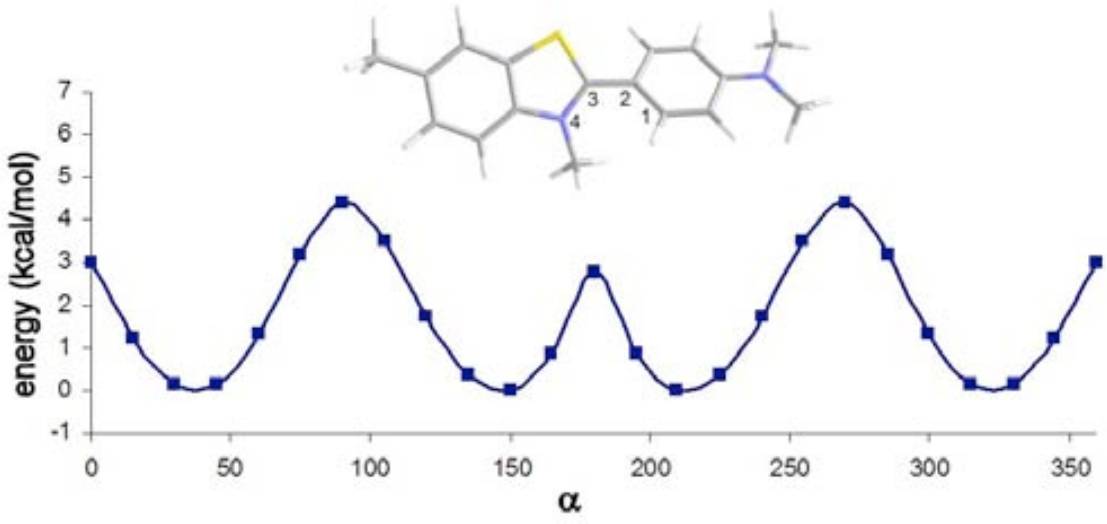


Figura 5.4. Representació de l'energia potencial obtinguda en base a càlculs B3LYP envers l'angle de torsió (definit pels àtoms enumerats del 1-4) del catió ThT^+.

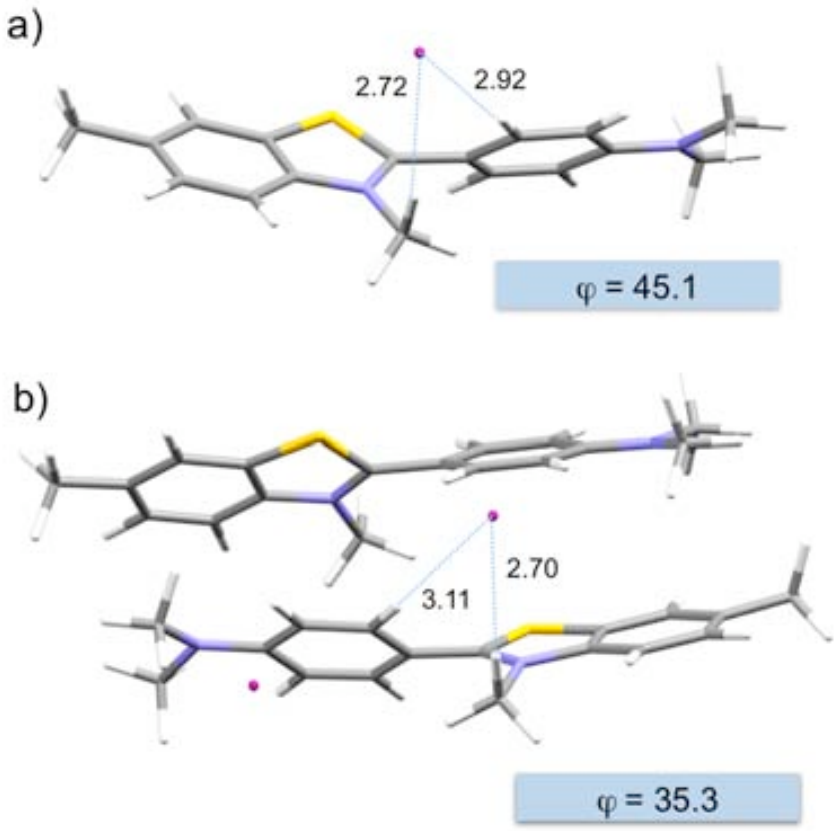


Figura 5.5 Geometries optimitzades en base a càlculs B3LYP i B3LYP-D, distàncies i angles trobats per als sistemes estudiats: (a) (ThT)I i (b) $(ThT)_2I_2$. Distàncies en angstroms i angles en graus.

Per analitzar l'apilament de cations ThT^+ que té lloc a les estructures cristal·lines **(1)** i **(2)** s'han realitzat càlculs periòdics B3LYP-D. Les optimitzacions geomètriques s'han dut a terme per a les posicions atòmiques internes mentre que els paràmetres de cel·la han estat fixats d'acord amb els valors experimentals trobats per dades cristal·logràfiques. Per examinar la contribució de les forces dispersives dins l'estructura cristal·lina s'ha calculat la variació de la dispersió quan un catió ThT^+ s'intercala dins d'un conjunt apilat de cations. Els resultats trobats, basats en càlculs purament dispersius, indiquen que el procés d'intercal·lació porta associat una energia de dispersió estabilitzant de -47 kcal·mol^{-1} per al cristall **(1)** i -44 kcal·mol^{-1} per al **(2)**. Aquesta petita diferència energètica està d'acord amb el major solapament entre els cations ThT^+ observat en **1** que en **2**.

Pel que fa al valor de φ obtingut per a la ThT^+ mitjançant càlculs periòdics (B3LYP-D) en els cristalls **1** i **2**, s'ha obtingut 20 i 19º, respectivament. Aquests valors presenten una bona concordança amb els angles trobats per difracció de raigs X (24º **(1)** i 20º **(2)**). Aquest fet posa de manifest la importància de les forces dispersives dins la cel·la elemental del cristall.

5.3. Predicció de la interacció ThT^+-pèptid $A\beta_{1-42}$

D'acord amb les dades trobades en la bibliografia, és escassa la informació de la que es disposa a nivell molecular sobre la interacció ThT^+-fibres amiloides, així com els requeriments estructurals que cal tenir en compte a l'hora de dissenyar molècules que presentin especificitat per les fibres Aβ. Amb la finalitat de contribuir des d'un punt de vista teòric en el coneixement de la interacció ThT^+ amb les fibres, els modes/llocs d'unió preferents i poder predir quin fragment del catió caldria modificar per millorar l'especificitat per les fibres Aβ s'han realitzat: (1) estudis d'acoblament (també coneguts com estudis de *docking*), (2) dinàmica molecular i (3) càlculs quàntics del catió ThT^+ amb el pèptid $A\beta_{1-42}$.

5.3.1 Estudis d'acoblament lligand-proteïna (*Docking*)

Els estudis de *docking*, pretenen explorar de forma exhaustiva les posicions relatives lligand-proteïna, avaluant les interaccions intermoleculars en cadascuna de les posicions explorades. Com a resultat d'aquest procés, s'obté una col·lecció de posicions d'acoblament lligand-proteïna, que el programa utilitzat en aquest treball (Autodock 4.0), ordena i avalua des d'un punt de vista estructural i energètic.[214]

Per començar aquest estudi, cal disposar de l'estructura cristal·lina de la proteïna. En el nostre cas, l'estructura cristal·lina del pèptid $A\beta_{1-42}$ no ha estat encara resolta degut a la dificultat que implica cristal·litzar una proteïna de naturalesa amiloidogènica. No obstant, com s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesi, es disposa d'un bon model d'estructura 3D del pèptid $A\beta_{1-42}$

obtingut mitjançant tècniques de RMN en solució, mutagènesi dirigida i microscòpia crioelectrònica (PDB: 2BEG).[46] Aquest model s'ha pres com a punt de partida per realitzar els estudis d'acoblament lligand-proteïna. Els resultats obtinguts situen als cations ThT^+ en canals paral·lels a l'eix de creixement de la fibra, d'acord amb les propostes de Krebs i col. per dades de microscòpia confocal.[58]

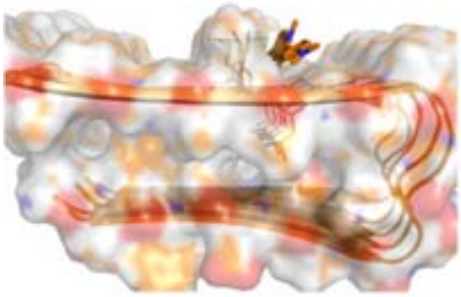
Per a cada posició obtinguda s'ha avaluat l'afinitat de la interacció ThT^+ - $A\beta_{1-42}$ mitjançant una funció de puntuació (*scoring*).[ζ 215] Un cop realitzat aquest procés, s'han identificat 6 modes d'unió (poses), és a dir, 6 orientacions i conformacions diferents que adopta el catió ThT^+ en el pèptid $A\beta_{1-42}$, els quals es situen en 4 llocs diferents : dos externs i dos superficials (Figura 5.6).

5.3.2. Estudis de dinàmica molecular

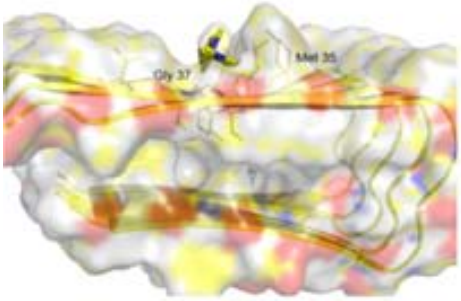
Les aproximacions de *docking* permeten calcular d'una manera ràpida l'energia lliure associada a l'afinitat del sistema lligand:proteïna. No obstant, les molècules no romanen fixes en les seves geometries òptimes, sinó que poden fluctuar i moure's al llarg del temps adaptant-se als seu entorn i responent a pertorbacions tèrmiques. Són precisament aquestes adaptacions les que permeten les interaccions lligand-proteïna, i per tant l'estudi dinàmic de les molècules és de vital importància en els mètodes computacionals per al disseny de fàrmacs.[216,217]

Amb la finalitat de realitzar un estudi més minuciós sobre les possibles interaccions entre el catió ThT^+ i el pèptid $A\beta$, s'ha fet una anàlisi per dinàmica molecular (DM) de cadascuna de les conformacions finals resultants de l'exploració de *docking*. La metodologia DM permet estudiar el comportament del sistema en funció del temps, tot simulant la dinàmica del sistema mitjançant la integració de les equacions de Newton del moviment per a cada àtom. Això permet predir les energies lliures d'unió lligand-proteïna, que alhora ens dóna l'optimització geomètrica corresponent per a l'estructura molecular amb mínima energia. Els resultats d'aquests estudis de DM demostren que els modes d'unió més favorables per al catió ThT^+ en les fibres amiloides correspon a A i B1 situats a la superfície i definits pels residus 33-35 i 35-37, respectivament (Figura 5.6). Pel que fa a les interaccions a nivell molecular s'observa que en ambdues poses, A i B1, l'anell de la dimetilanilina es col·loca paral·lel a l'esquelet de la cadena polipeptídica. La facilitat que presenta el catió ThT^+ per rotar a través de l'enllaç C-C, permet que el fragment benzotiazol disposi el grup NMe^+ cap a l'exterior del canal definit per les fibres. D'entre les dues posicions el mode d'unió B1 és 2.6 $kcal \cdot mol^{-1}$ més estable que la posició A (Taula 5.2).

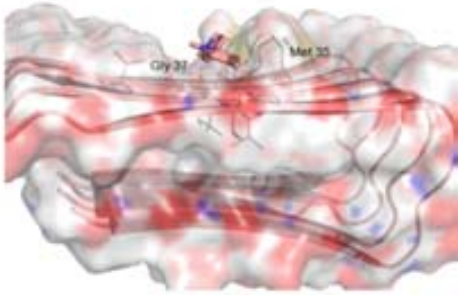
ζ funció que contempla dades energètiques i estructurals per a cada lloc d'unió



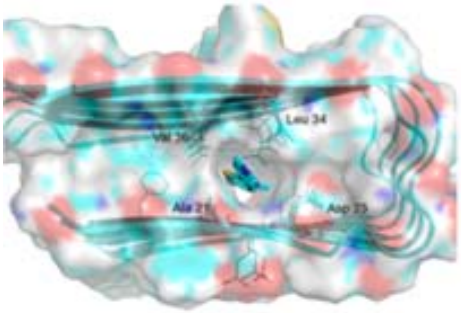
pose A



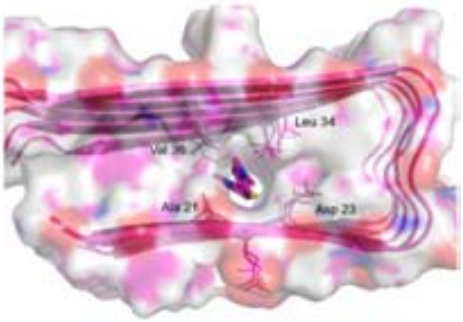
pose B1



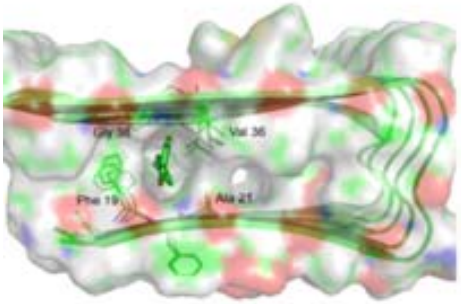
pose B2



pose C1



pose C2



pose D

Figura 5.6. Els 6 modes d'unió obtinguts mitjançant els estudis acoblament ThT^+-pèptid $A\beta_{1-42}$, els quals es situen en posicions internes (C1, C2 i D) i externes (A, B1 i B2).

En base a les dades obtingudes per DM, es pot calcular l'angle diedre que presenta el catió ThT^+ a l'interaccionar amb el pèptid en la seva posició més estable (B1) i obtenint-se un angle de torsió de 44º. Seguint la mateixa metodologia, el catió ThT^+ lliure mostra una desviació del pla de 65.43º. Aquest resultats de φ demostren que la interacció lligand-pèptid dificulta la rotació al voltant de l'enllaç C-C i per tant, s'observa una disminució del valor de l'angle φ respecte al catió ThT^+ lliure. Si bé es pot observar que el valor de φ de la ThT^+ lliure obtingut mitjançant DM és significativament major a l'obtingut per càlculs B3LYP en fase gas (35º) aquestes diferències són degudes a la metodologia de càlcul emprada.

Taula 5.2. Modes d'unió, energia lliure associada a cadascun d'ells i afinitat relativa.

binding pose	ΔG (Autodock, kcal/mol)	ΔΔG (LIE, kcal/mol)[a]	torsion (SCCC)
D	-9.3	4.5	53.56
C1	-8.5	11.4	73.86
C2	-8	3.16	71.79
B1	-6.7	0	44.29
B2	-6.7	-	-
A	-6.3	2.6	66.92
Water	-	-	65.43

[a] Only relative affinities are reported, taking the most favored binding mode (B1) as the reference state.
[b] Binding mode B2 was not stable along the MD trajectory.

5.3.3. Estudis químico-quàntics del catió ThT^+ amb la cadena polipeptídica l'estructura tipus fulla β

Amb la finalitat d'analitzar les interaccions a nivell atòmic entre el catió ThT^+ i les fibres amiloides s'han realitzat estudis quàntics amb un model d'estructura fulla β. Si bé el cost computacional és major que en el cas dels estudis de *docking* i de DM, explorar sistemes relativament petits considerant la seva distribució electrònica té avantatges respecte a la utilització de la DM, com la qualitat dels valors corresponents a les distàncies i angles de les molècules estudiades.

El sistema estudiat consisteix en un model simplificat de cadena polipeptídica on tots els residus de les cadenes laterals del pèptid $A\beta_{1-42}$, han estat substituïts per Gly. L'orientació del catió ThT^+ que s'utilitza com a punt de partida per a realitzar el càlcul quàntic correspon a la de la posició B1 resultant dels estudis de DM.

El mètode de càlcul utilitzat ha estat el B3LYP amb correccions de dispersió (B3LYP-D). L'estructura de mínima energia obtinguda seguint aquesta metodologia evidencia que el

fragment dimetilanilina es disposa paral·lel a l'esquelet polipeptídic (Figura 5.7) establint interaccions del tipus π–π, la distància entre el centroid de l'anell de benzè i el pla mig definit per l'enllaç peptídic situat sota d'aquest, és de 3.01 Å. Addicionalment, el fragment benzotiazol i els residus Gly estableixen una interacció estabilitzant de tipus CH-π a una distància de 2.94 Å. L'angle φ observat entre els fragments dimetilanilina i benzotiazol és 21º.
Cal remarcar, que l'estabilitat ve donada per les interaccions del tipus π–π i CH-π atès que si es realitza el mateix càlcul en base a càlculs B3LYP sense tenir en compte el factor de les forces dispersives, el fragment dimetilanilina no roman paral·lel a l'esquelet polipeptídic presentant una distància entre el centroid de l'anell de benzè i el pla mig definit per l'enllaç peptídic per sobre de 4.0 Å i un angle diedre de 32º.

Pel que fa al fragment benzotiazol, la interacció CH-π que estableix amb el residu aminoacídic de la cadena polipeptídica és el que influeix més directament en l'angle diedre φ i per tant en les propietats fluorescents de la ThT^+ donat que existeix una disminució en la relaxació torsional. És per això que atribuïm la capacitat de modular l'especificitat a aquest fragment.

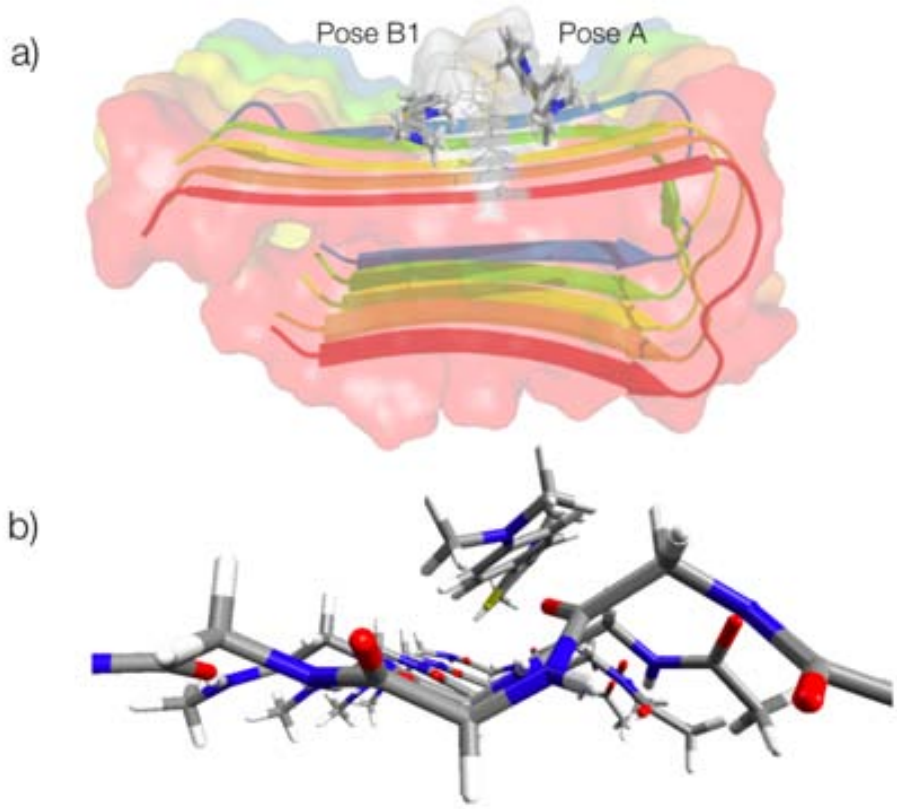


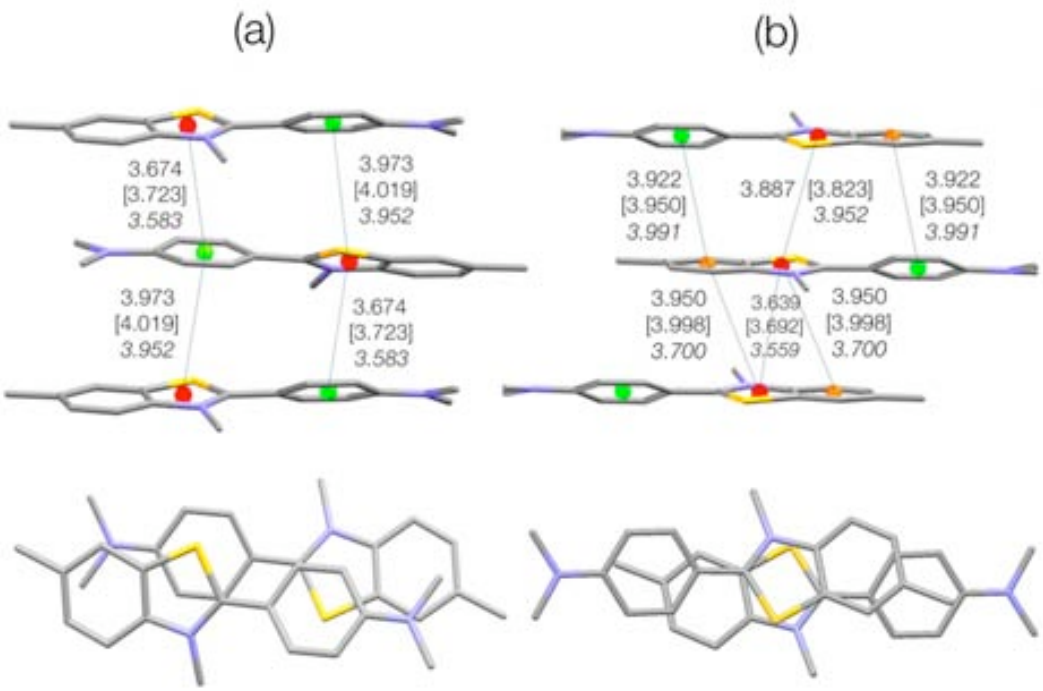
Figura 5.7. (a) Llocs d'unió externs on es situa el catió ThT^+ en les fibres $A\beta_{1\text{-}42}$ segons resutats obtinguts del *docking* b) Estructura del catió ThT^+ interaccionant amb un pèptid model (vegi's text)

5.4. Conclusions

Si bé el catió ThT^+ ha estat un bon referent com agent de tinció de les fibres amiloides, encara es desconeix com interaccionen mútuament a nivell molecular. Amb la finalitat d'esbrinar la disposició, els lloc d'unió i el tipus d'interaccions que estableix el catió ThT^+ a enllaçar-se a les plaques amiloides s'han realitzat estudis experimentals i teòrics que han permès arribar a les següents conclusions:

1. S'ha cristal·litzat el catió ThT^+ i s'han obtingut dos tipus de cristalls diferents que s'han caracteritzat com a $(ThT)_2I_4{\cdot}2CHCl_3$ **(1)**, i $(ThT)I{\cdot}CHCl_3$ **(2)**. Els cations ThT^+ en **(1)** i **(2)** presenten paràmetres geomètrics molt semblants, el més rellevant de tots ells és l'angle diedre, φ, el qual és 24º per al cristall **(1)** i 20º per al **(2).**

2. Els cations ThT^+, d'ambdues estructures cristal·lines, s'apilen formant columnes disposant-se en forma cap i cua (*head to tail*) a fi de minimitzar les repulsions electroestàtiques entre els grups $-NMe^+$. Les distàncies entre els cations apilats estan compreses entre 3.6 i 3.9 Å atribuïbles a interaccions π-stacking. Aquestes forces d'interacció donen lloc a diferents apilaments entre els cations ThT^+ observant-se un solapament Th-Ph (anell tiazol i la dimetilanilina) en **(1)**, i dos solapaments diferents: (a) Th-Th i (b) parcialment entre Bz-Ph (on Bz denota l'anell de benzè unit al tiazol) en **(2)**.

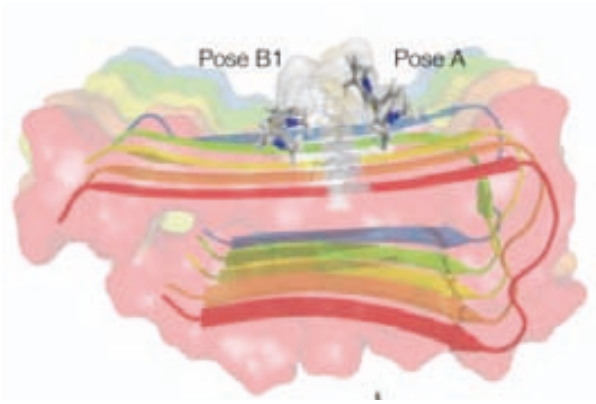


3. Estudis teòrics en base a càlculs B3LYP en fase gas del catió ThT^+ demostren que el cost energètic de la rotació al voltant de l'enllaç C-C del catió ThT^+ lliure és baix, *ca.* 5 kcal·mol^{-1} , la qual cosa mostra que l'angle φ estarà modulat per l'entorn al qual estigui exposat el catió ThT^+. Mitjançant un estudi teòric del cristall en base a càlculs periòdics B3LYP, els quals inclouen forces dispersives, s'ha calculat : (1) el valor d'angle diedre per al catió ThT^+ en cada compost (19º per a **1** i 20º per a **2**) i (2) les distàncies entre els cations apilats successivament. Tots els valors teòrics obtinguts presenten una bona concordança amb els trobats per difracció de raigs X. Aquest fet posa de manifest la importància de les forces dispersives dins la cel·la elemental del cristall.

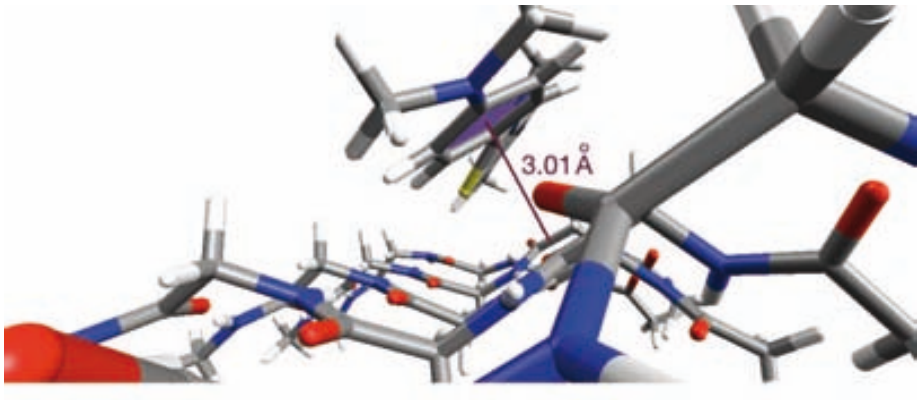
4. A fi d'analitzar si les interaccions tipus π són rellevants en el sistema ThT^+-fibres Aβ s'han realitzat estudis de *docking*, dinàmica molecular i càlculs quàntics.

Els estudis de *docking* s'han utilitzat com a punt de partida per explorar els possibles llocs d'unió que pot ocupar el catió ThT^+ en les fibres Aβ_{1-42}. Per realitzar els estudis d'acoblament s'ha utilitzat el millor model fins ara resolt d'estructura 3D d'un protofil·lament de pèptid Aβ_{1-42} [46] i s'han obtingut sis modes d'unió preferents ThT^+-Aβ_{1-42}.

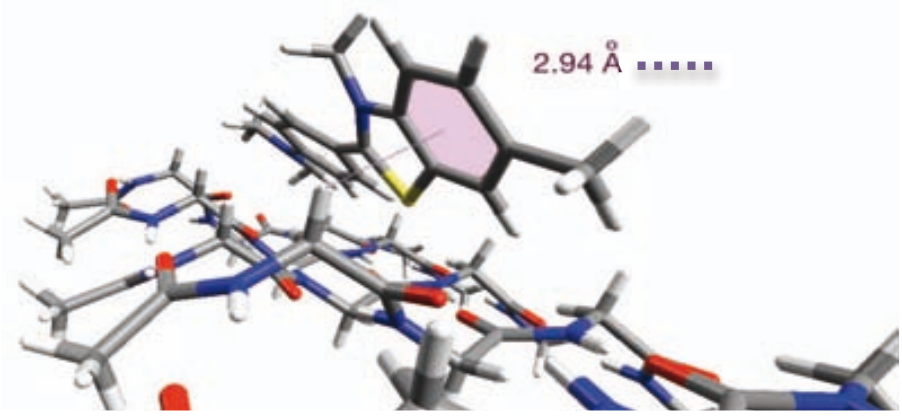
Posteriorment, s'ha realitzat un estudi de dinàmica molecular (DM) per a cadascuna de les conformacions finals resultants de l'exploració de *docking* i s'ha demostrat que els llocs d'unió més favorables energèticament per al catió ThT^+ en les fibres amiloides corresponen a la pose A i B1 (Figura), situades a la superfície de la fibra i definides pels residus 33-35 i 35-37, D'entre les dues posicions la pose B1 és 2.6 kcal·mol^{-1} més estable que la posició A.



5. Càlculs quàntics realitzats amb un model simplificat del pèptid Aβ_{1-42}, en el qual els residus de les cadenes laterals han estat substituïts per aminoàcids Gly, i el catió ThT^+ evidencien que el fragment dimetilanilina es disposa paral·lel a l'esquelet polipeptídic establint interaccions del tipus π–π. La distància entre el centroid de l'anell de benzè i el pla mig definit per l'enllaç peptídic situat sota d'aquest, és de 3.01 Å. D'altra banda, s'observa que el fragment benzotiazol i els residus Gly estableixen una interacció estabilitzant de tipus CH-π a una distància de 2.94 Å. L'angle φ del catió ThT^+ situat en aquest lloc d'unió és 21º, proper al valor obtingut en l'estructura cristal·lina determinada experimentalment.



6. La interacció CH-π que estableix el fragment benzotiazol amb l'aminoàcid de la cadena polipeptídica influeix directament en l'angle diedre φ i per tant, en les propietats fluorescents del catió ThT^+. Aquest fet ens suggereix que modificacions en aquest fragment de la molècula podrien conferir l'especificitat que es requereix per a poder dissenyar un bon agent de diagnosi o teràpia per a la MA.



IV. CONCLUSIONS GENERALS

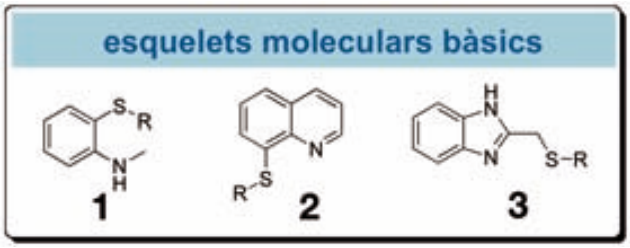
El treball que s'emmarca en aquesta tesi ha permès arribar a un conjunt de conclusions les quals s'exposen a continuació agrupades d'acord amb els diferents objectius proposats.

Utilització de tècniques quimioinformàtiques en el disseny i selecció d'agents quelants multifuncionals amb potencial aplicació en la malaltia d'Alzheimer (MA)

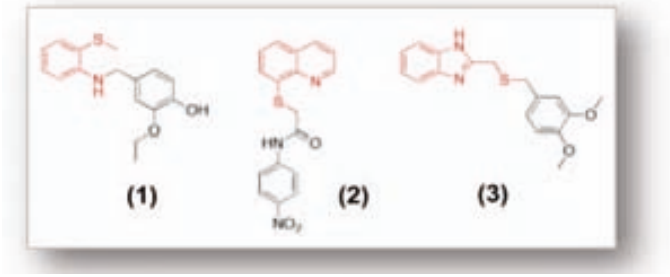
1. La utilització de la quimioinformàtica en el camp de la química de coordinació aplicada a la medicina s'ha demostrat útil, eficaç i potent. L'esquema general seguit consistent en: a) disseny de l'esquelet molecular, b) cerca dels compostos comercials que el contenen, c) filtratge segons propietats fisicoquímiques i farmacocinètiques addicionals i d) assajos experimentals per ampliar les prestacions i/o corroborar la idoneïtat dels compostos seleccionats, s'ha demostrat perfectament vàlid.

2. La posta a punt de la metodologia anterior ha palesat que el punt de partida, el disseny de l'esquelet del compost, és un pas fonamental per assolir una bona selecció de compostos amb potencial aplicació. Així, si hom cerca un agent quelant multifuncional cal partir d'un esquelet que pugui evitar l'addició de fragments i/o grups funcionals que podrien malmetre la seva aplicació posterior.

3. En base a la química de coordinació i bioinorgànica dels ions Cu(II) i Zn(II) s'han escollit tres entorns de coordinació amb àtoms donadors de N, S i O que donin lloc a anells quelants de 5 baules, segons s'indica a continuació:



4. La cerca de compostos comercials que continguin aquests esquelets i que alhora compleixin els requisit d'hidrofobicitat (log BB ...) i susceptibilitat de ser marcats amb iode ha exigit incorporar un anell aromàtic als esquelets anteriors el que finalment ha portat als compostos comercials següents:

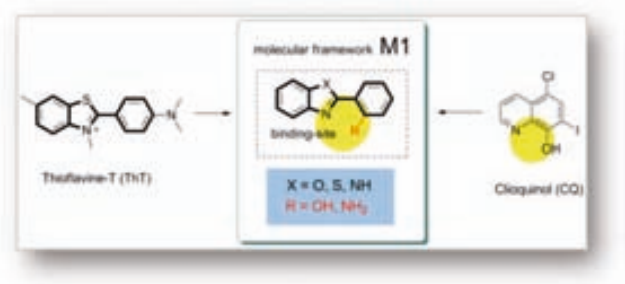


5. El procés experimental s'ha iniciat amb la determinació espectrofotomètrica de les constant de formació del lligand **1** envers Cu(II) i Zn(II), el qual requereix la determinació prèvia de les seves constant d'acidesa. Els resultats obtinguts de les valoracions espectrofotomètriques indiquen que la capacitat del lligand TMET per coordinar Cu(II) (log β_1 = 8.93; log β_2 = 15.21) i Zn(II) (log β_1 = 8.52; log β_2 = 14.12) és comparable. Els valors de β evidencien que els àtoms donadors són els àtoms d'oxigen dels grups etoxi i fenolat. Aquests valors són concordants amb els trobats a la bibliografia pel 2-hidroxifenol.

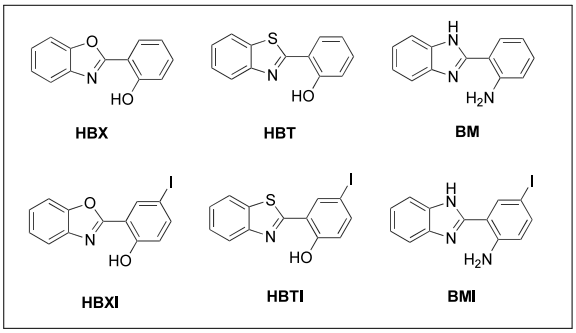
6. La coordinació del lligand TMET via O(fenolat),O(èter) no exclou que en presència de més metall els grups tioèter i amina també poguessin participar en la coordinació, introduint-se així la possibilitat de formació de complexos d'elevada nuclearitat i possible insolubilitat. En conjunt, les eines *in silico* han acomplert la seva finalitat, però els resultats experimentals ens indiquen la conveniència de reiniciar el procés afinant més el disseny de l'esquelet del lligand multifuncional per aplicació a la MA.

Agents terapèutics i de diagnosi en la MA: disseny, selecció i caracterització de compostos quelants amb propietats d'intercalació en fibres amiloides

7. A fi de construir l'esquelet estructural bàsic dels lligands multifuncionals s'ha pres com a referència una de les molècules més àmpliament utilitzada com a agent de tinció de les fibres amiloides: la ThT. L'eliminació del grup metil enllaçat al N heterocíclic perquè la molècula esdevingui neutra així com així com la incorporació d'un anell fenol o anilina ha permès obtenir **M1**, un esquelet molecular que inclou simultàniament propietats intercaladores i coordinants. Addicionalment, aquest esquelet és susceptible de ser iodat i també actuar com agent antioxidant.



8. La cerca de **M1** en bases de dades comercials, ha permès generar 3 quimioteques virtuals. A fi de seleccionar els millors candidats s'ha dut a terme un cribatge virtual en base a un conjunt de filtres que ens han permès obtenir aquelles molècules amb propietats farmacocinètiques i d'hidrofobicitat adequades per a futures aplicacions en medis fisiològics. Aquest procés ha donat lloc a 36 molècules de les quals s'han seleccionat tres candidats per a realitzar el treball experimental (**HBX**, **HBT** i **BM**). La presència d'un anell fenol i/o anilina en **M1** ha estat fonamental per iodar fàcilment i exitosa les molècules **HBX**, **HBT** i **BM** seguint metodologies freqüentment utilitzades per al marcatge de molècules amb ^{123}I. S'han obtingut **HBXI, HBTI** i **BMI**.



9. L'obtenció de cristalls i la posterior resolució de les estructures dels tres lligands iodats (**HBXI, HBTI** i **BMI)** han demostrat l'existència d'un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el N(sp^2) de l'anell heterocíclic i el grup O-H (**HBXI** i **HBTI**) o N-H (**BMI**) el qual és responsable de conferir planaritat als lligands **HBXI** (φ = 4.6º) i **HBTI** (φ = 5.1º). Si bé el lligand **BMI** presenta el mateix tipus d'enllaç, l'angle diedre, φ, és clarament superior (24.4º) que en els dos lligands anteriors. Càlculs B3LYP en fase gas dels tres lligands ens han permès explicar la importància del pont d'hidrogen en la conformació que presenten aquests lligands i atribuir el diferent angle diedre que presenta **BMI** respecte a **HBXI** i **HBTI** a efectes de l'empaquetament cristal·lí provocats per l'existència d'un àtom de iode en l'estructura del compost.

10. La síntesi dels complexos dels lligands **HBXI, HBTI** i **BMI** amb Cu(II) i Zn(II) ha donat lloc a complexos ML_2. Estudis de EPR realitzats amb els complexos CuL_2 evidencien la seva mononuclearitat i una geometria de coordinació plano quadrada amb distorsió tetraèdrica. Addicionalment, estudis B3LYP en fase gas han corroborat les dades obtingudes mitjançant EPR per als complexos CuL_2. D'acord amb les constants de formació obtingudes en solució, els càlculs en fase gas indiquen que els complexos ZnL_2 són mononuclears amb geometria de coordinació tetraèdrica.

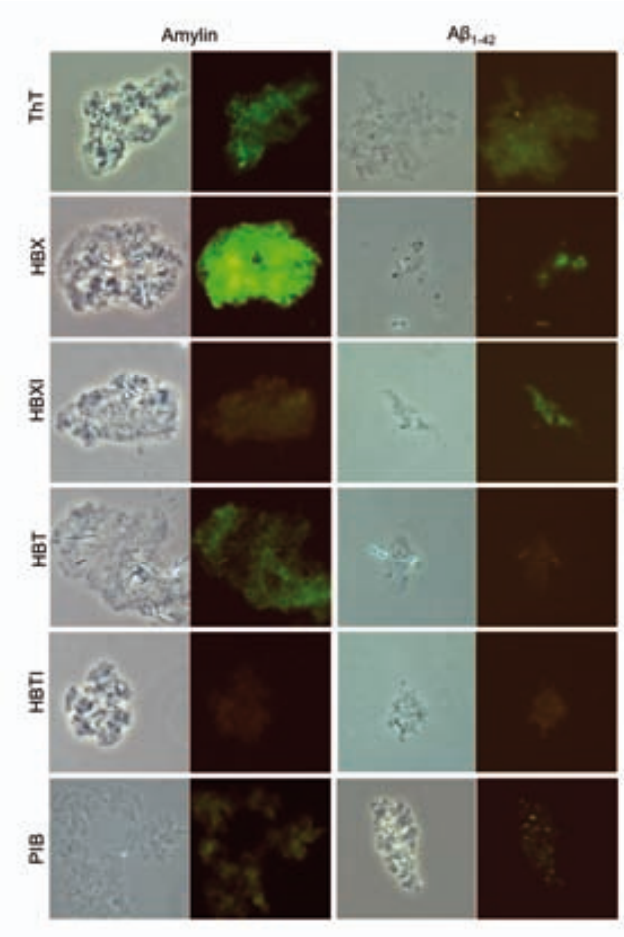
11. D'acord amb els valors de log β determinats espectrofotomètricament pels complexos formats per: **HBXI, HBTI, BMI** i HCQ, aquests mostren una major afinitat per Cu(II) que per Zn(II), si bé en ambdós casos es segueix l'ordre: **HBXI >** HCQ > **HBTI > BMI.** Aquests resultats permeten anticipar que aquests lligands, en particular de **HBXI** i **HBTI**, poden actuar com a segrestadors de Cu(II) i Zn(II) coordinats al pèptid Aβ en solució.

	Ligand [a]		Cu(II) [b]			Zn(II) [b]		
	pKa_1	pKa_2	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	pCu	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	pZn
HBXI	[c]	9.978 (9)	14.444 (9)	23.06 (7)	11.06	13.55 (8)	22.25 (9)	10.98
HBTI	[c]	8.11 (1)	12.049 (9)	20.29 (2)	10.52	11.68 (1)	19.68 (4)	10.91
BMI	3.650 (2)	7.440 (8)	10.347 (9)	19.19 (2)	9.46	10.87 (7)	18.53 (7)	10.55
HCQ	1.94 (5)	8.300 (2)	12.48 (4)	21.91 (3)	10.77	12.141 (8)	20.23 (1)	11.22

[a] Les constants d'acidesa corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $H_2L \leftrightarrows HL + H$ (pKa_1); $HL \leftrightarrows L + H$ (pKa_2).
[b] Les constants de formació corresponen a les següents reaccions (s'ometen les càrregues per una major claredat): $M(II) + L \leftrightarrows ML$ ($\log \beta_1$); $M(II) + 2L \leftrightarrows ML_2$ ($\log \beta_2$).
[c] El valor de pKa_1 és massa baix per ser determinat en l'interval de pH

12. En base a les dades de turbidimetria, els compostos **HBXI**, **HBTI** i **BMI** actuen com a inhibidors de l'agregació de fibres Aβ en absència de metalls, presentant una capacitat d'inhibició superior a l'EDTA i a HCQ, escollits com a compostos de referència. Aquests mateixos lligands, en presència de Cu(II), disminueixen més eficaçment la formació de fibres, seguint l'ordre **HBXI** > **HBTI** > **BMI**, el qual és paral·lel a la seva capacitat coordinant. Cal remarcar que en presència de Zn(II), l'únic lligand que presenta característiques inhibidores és el **HBTI**, millorant inclús el comportament del HCQ.

13. Segons les dades de microscòpia de fluorescència, els lligands **HBX** i **HBT** s'intercalen en les fibres Aβ molt satisfactòriament. Comparant amb el compost PIB, un radiotraçador en proves clíniques que s'enllaça a les plaques senils *in vivo*, i la ThT, agent de tinció àmpliament utilitzat, la intensitat d'aquesta intercalació segueix l'ordre: **HBX >** ThT > **HBT** > PIB. Respecte els compostos iodats, les excel·lents propietats intercaladores que mostren els lligands **HBXI** i **HBTI**, suggereixen proposar aquests compostos com a possibles ^{123}I-radiotraçadors per al diagnòstic *in vivo* per tècniques tipus SPECT.

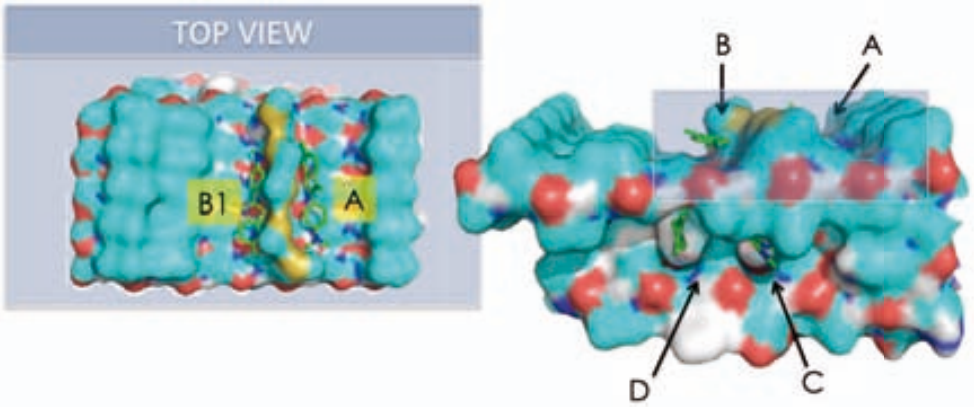


14. En resum, els compostos comercials escollits tenen les característiques d'hidrofobicitat i capacitat de iodació adequades per a la seva aplicació com agents de teràpia i/o diagnosi en la MA. Això, juntament amb les bones propietats d'intercalació en fibres amiloides i l'habilitat d'enllaçar els ions Cu(II) i Zn(II) presents en les mateixes ens han portat a iniciar una sèrie d'assajos *in vivo* amb ratolins transgènics malalts de MA.

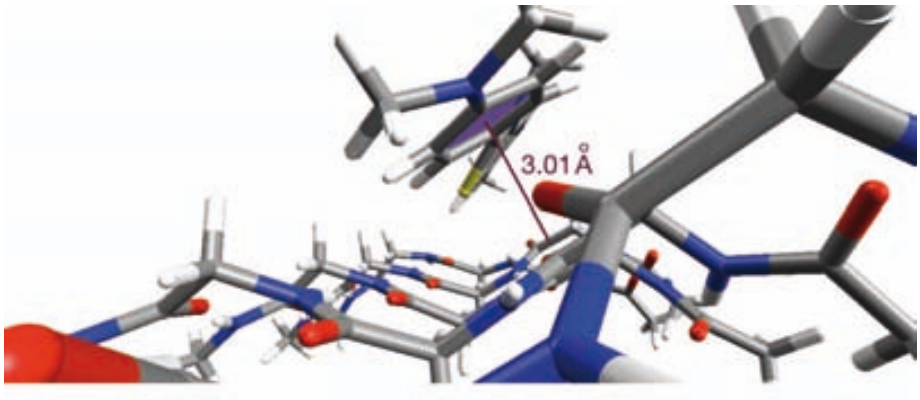
Interaccions del catió ThT^+ amb les fibres amiloides: determinació de l'estructura 3D del catió ThT^+ i estudi de la seva posició, orientació i energia en les fibres $A\beta_{1-42}$

15. El catió ThT^+ , que inclou un fragment benzotiazol i un anell dimetilanilina, ha donat lloc a dos formes cristal·lines diferents que s'han caracteritzat per difracció de raigs X com $(ThT)_2I_4 \cdot 2CHCl_3$ **(1)** i $(ThT)I \cdot CHCl_3$ **(2)**. Els cations ThT^+ en **(1)** i **(2)** presenten paràmetres geomètrics molt semblants, el més rellevant de tots ells és l'angle diedre, φ, format pels dos fragments esmentats, el qual és 24º per **(1)** i 20º per **(2).** Mitjançant un estudi teòric del cristall, en base a càlculs periòdics B3LYP que inclouen forces dispersives, s'obtenen valors d'angle diedre per als cations ThT^+ (19º per **1** i 20º per **2**) molt comparables a les dades cristal·logràfiques. Tant els resultats experimentals com els teòrics, així com la seva bona concordança, demostren la importància de les forces dispersives entre cations ThT^+ veïns, i en conseqüència la seva influència en l'angle diedre que determina les propietats fluorescents.

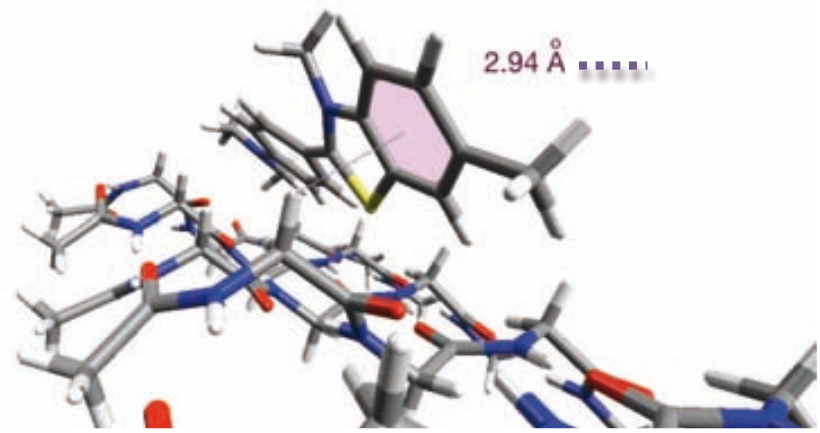
16. A fi d'esbrinar les preferències de posició i orientació del catió ThT^+ a les fibres $A\beta$ s'han realitzat estudis de *docking*, dinàmica molecular i càlculs quàntics obtenint-se els següents resultats: (1) el catió ThT^+ es pot enllaçar al pèptid $A\beta_{1-42}$ en 4 posicions diferents: dues externes (A i B) i dues internes (C i D), adoptant 6 orientacions diferents (A, B1, B2, C1, C2 i D); (2) de tots aquests modes d'unió, els més favorables energèticament corresponen a A i B1, ambdós situats a la superfície de la fibra i definits pels residus 33-35 i 35-37, respectivament; (3) la posició B1 és 2.6 $kcal \cdot mol^{-1}$ més estable que la posició A.



17. Càlculs quàntics de la interacció del catió ThT^+ realitzats amb un model simplificat del pèptid $A\beta_{1-42}$, en el qual els residus de les cadenes laterals han estat substituïts per aminoàcids Gly, evidencien que el fragment dimetilanilina roman paral·lel a l'esquelet polipeptídic de l'estructura tipus fulla β establint interaccions π-stacking a una distància de 3.01 Å.



18. Addicionalment, el fragment benzotiazol amb l'aminoàcid de la cadena polipeptídica (Gly) estableixen una interacció de tipus CH-π, la qual influeix en el valor de l'angle diedre φ del catió ThT^+ i, per tant, en les seves propietats fluorescents. Aquest fet suggereix que modificacions en el fragment benzotiazol del catió podrien conferir l'especificitat que es requereix per a poder dissenyar un agent de diagnosi o teràpia específic per a la MA.



V. PROCEDIMENT EXPERIMENTALS I TÈCNIQUES UTILITZADES

V.1. Consideracions Generals

Materials. Els compostos comercials d'Aldrich: 2-etoxifenol (ETF), 2-metiltioanilina (TMA), 2-(2-hidroxifenil)benzoxazol (HBX), 2-(2-hidroxifenil)benzotiazol (HBT), 2-(2-aminophenyl)-*1H*-benzimidazol (BM) i clioquinol (CQ) han estat utilitzats sense necessitat de realitzar un previ procés de purificació. Les reaccions de iodació s'han dut a terme en absència de llum i utilitzant MeOH i CH_2Cl_2 prèviament destil·lats sobre CaH_2. Aigua de puresa Milli-Q i etanol absolut de qualitat HPLC-UV-IR (99.9%) s'han requerit per preparar totes les solucions emprades en les valoracions espectrofotomètriques. En aquests assajos s'ha utilitzat clorur de sodi o perclorat de sodi per fixar la força iònica del medi, àcid clorhídric i perclòric, solució estàndard d'hidròxid de NaOH (0.50M), com agent valorant i solucions estàndard de Cu(II) i Zn(II).

Instrumentació. Els espectres de ressonància magnetica nuclear (RMN) han estat enregistrats al Servei de RMN de la *Universitat Autònoma de Barcelona* i de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC), mitjançant espectròmetres de la firma BRUKER model AC250 (250 MHz per a ^{1}H i 62.5 MHz per a ^{13}C) i Varian Unity 300 (300 MHz a ^{1}H i 75 MHz per a ^{13}C) respectivament, a 298 K. Els desplaçaments es donen en δ (ppm), utilitzant com a referència interna el propi dissolvent deuterat. Les abreviatures utilitzades per descriure la multiplicitat de les senyals observades són les següents: s (singlet), t (triplet), td (triple doblet), m (multiplet) i J per indicar en Hz la constant d'acoblament protó-protó a n enllaços. Els espectres de masses s'han enregistrat al Servei de Masses del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona emprant-se tècniques d'Electroesprai (ESI) i Ionització Química (CI). Les anàlisis de C, H, N i S s'han realitzat al Servei de Microanàlisis del CSIC-IIQAB mitjançant un analitzador elemental Carlo-Erba CHN EA-1108. Els difractogrames de raig-X s'han enregistrat en un difractòmetre Bruker SMART APEX amb detector d'àrea, radiació K del Mo (λ = 0.71073 Å). Pel que fa a l'adquisició de dades s'ha utilitzat el programa SMART (versió 5.631) Bruker AXS. El refinament de la cel·la i reducció de dades amb el programa SAINT (versió 6.45A) Bruker AXS i la correcció d'absorció, amb el programa SADABS. Els espectres UV-vis s'han enregistrat en un espectrofotòmetre Hewlett-Packard 8452A *diode array* amb control de temperatura. Altres detalls sobre les valoracions espectrofotomètriques s'expliquen al punt V.2 d'aquest apartat.

V.2. Estudi espectrofotomètric de les constants d'acidesa i de les constants de formació dels lligands vs Cu(II) i Zn(II)

V.2.1 Muntatge experimental

La metodologia experimental inclou d'una banda una valoració espectrofotomètrica i de l'altra la utilització del programa pHab2000 elaborat pel Dr. Peter Gans (University of Leeds).[38] D'acord amb l'Esquema 1 (vegi's al *capítol 3*), tots els experiments s'han dut a terme dins una cel·la de 125 mm d'alçada, 58 mm de diàmetre i 50 ml de volum prevista d'una camisa que manté la temperatura constant a 37ºC a través d'un bany termostàtic (*Thermo Haake DC10*). Per dur a terme la valoració, petits volums de NaOH estàndar s'addicionen a la cel·la mitjançant una microbureta Hamilton (1-1000 ml), aquesta es controla amb un programa en entorn QBASIC. Per mesurar el pH s'utilitza un elèctrode combinat i un pH-metre *Knick*. Cal mantenir l'agitació constant en tot moment per facilitar la homogeneïtat de la mostra. Mitjançant una bomba peristàltica *Ismatec Reglo* amb un cabal fixat a 2 $ml \cdot min^{-1}$ i tubs de Tefló i Tygon, la mostra és transportada des de la cel·la, on té lloc la valoració a una cubeta de quarz de flux continu de 10 mm de pas de llum, on tindrà lloc l'enregistrament de l'espectre mitjançant un espectrofotòmetre *HP-8452A UV-Vis diode array*. Totes les solucions han estat preparades en aigua Milli-Q excepte les solucions dels lligands que ho han estat en etanol del 99.9%.

El medi de treball és una solució etanol:aigua per assegurar la solubilitat dels lligands estudiats. La temperatura i la força iònica del medi són fixades a 0.1 M mitjançant $NaClO_4$ o NaCl, depenent de l'experiment i 37ºC per a reproduir les condicions fisiològiques. La calibració de l'elèctrode es duu a terme mitjançant el mètode de Gran[218,219] a les mateixes condicions experimentals.

V.2.2 Determinació de les constants d'acidesa dels lligands

Abans de procedir a la valoració de cada lligand, es calibra l'elèctrode mitjançant el mètode de Gran i s'enregistra l'espectre del blanc. El medi de treball és una solució etanol:aigua per assegurar la solubilitat dels lligands estudiats. Per determinar els pKas es fan petites addicions de NaOH estàndard a una solució etanol:aigua que conté: el lligand a estudiar, un volum conegut d'àcid, una sal inert per ajustar la força iònica i solució tampó - si es requereix - per assolir amb més precisió el punt d'equivalència. Un cop enregistrat el primer espectre s'inicia la valoració del lligand anotant el valor de pH i enregistrant l'espectre després de cada addició de NaOH. Cal permetre un temps d'homogeneïtzació després de cada addició d'agent valorant. Per a cadascuna de les valoracions, s'enregistren almenys 30 espectres dins l'interval de pH comprès entre 2 i 11.

Els volums de les solucions emprades així com les concentracions dels reactius presents en la cel·la a l'inici de les valoracions es mostren a continuació per a cada experiment en forma de taula.

V.2.2.1. Lligands TMA, ETF i TMET

Les condicions de treball en totes aquestes valoracions són les següents: (a) medi etanol:aigua 40:60, (b) força iònica 0.10 M $NaClO_4$ i (c) T = 37ºC

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	20	9.28E-03
TMA	2.58E-04	20	1.03E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.109	

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	20	9.28E-03
TMET	1.04E-03	20	4.16E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.110	

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
	1.25E-02	10	2.50E-03
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
ETF	2.68E-04	20	1.07E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.107	

V.2.2.2. Lligands HBXI, HBTI, BMI i HCQ

Les condicions de treball en totes aquestes valoracions són les següents: (a) medi etanol:aigua 50:50, (b) força iònica 0.10 M NaCl i (c) T = 37ºC

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.1159	10	2.76E-02
BXI	1.02E-03	1	2.43E-05
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.106	

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.1159	10	2.76E-02
BTI	1.03E-03	1	2.45E-05
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.106	

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.1159	10	2.76E-02
BMI	1.03E-03	1	2.45E-05
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.106	

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
etanol		15	
NaCl	0.3	10	7.50E-02
HCl	0.1159	10	2.90E-02
CQ	9.95E-04	5	1.24E-04
TOTAL		40	
FORÇA IÒNICA		0.104	

V.2.3. Determinació de les constants de formació dels lligands envers Cu(II) i Zn(II)

El procediment experimental així com les condicions de treball utilitzades per a la determinació de les constants de formació d'aquests lligands amb Cu(II) i Zn(II) és el mateix que l'utilitzat per a la determinació dels respectius pKas. En aquest cas però, com es va explicar en el capítol 3 es realitzen dues famílies de valoracions per a controlar les condicions experimentals i simplificar el càlcul de les constants log β.

Les dades experimentals s'han obtingut enregistrant els espectres d'una solució en la qual la relació de concentracions entre el metall (M) i el lligand (L) es manté constant i el pH varia a l'addicionar NaOH en petits volums. Es realitzen dues valoracions per a cada sistema lligand-metall: *Valoració 1* - fixant la relació [L]/[M] adequada per a la formació del complex ML (excés de metall) i *Valoració 2* - fixant la relació [L]/[M] = 2 afavorint la formació de l'espècie ML_2 (excés de lligand). Es preparen solucions de Cu(II) i Zn(II) de concentració 0.02 M, aquestes són estandarditzades segons els mètodes descrits en la bibliografia.[220,221] A partir d'aquestes solucions *stock* es preparen solucions més diluïdes per a realitzar les valoracions.

Es calibra l'elèctrode mitjançant el mètode de Gran i s'enregistra l'espectre del blanc. La cel·la conté el volum adequat de les solucions prèviament preparades per assolir un medi de treball etanol:aigua desitjat. Aquesta solució es valora afegint petites addicions de NaOH estàndard 0.5 M. Un cop enregistrat el primer espectre s'inicia la valoració del lligand anotant el valor de pH i enregistrant l'espectre després de cada addició de NaOH. Cal permetre un temps d'homogeneïtzació després de cada addició d'agent valorant. Per a cadascuna de les valoracions, s'enregistren almenys 30 espectres dins l'interval de pH comprès entre 2 i 10.

Els volums de les solucions emprades així com les concentracions dels reactius presents en la cel·la a l'inici de les valoracions es mostren a continuació per a cada experiment en forma de taula.

V.2.3.1 Sistema TMA-Cu(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Cu(ClO_4)_2$	9.60E-04	10	1.92E-04
TMA	2.58E-04	20	1.03E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.107	
[L]/[M]	0.54		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Cu(ClO_4)_2$	2.40E-05	10	4.80E-05
TMA	2.58E-04	20	1.03E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.107	
[L]/[M]	2.11		

V.2.3.2 Sistema TMA-Zn(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Zn(ClO_4)_2$	8.44E-04	10	1.69E-04
TMA	2.58E-04	20	1.03E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.107	
[L]/[M]	0.61		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Zn(ClO_4)_2$	2.11E-04	10	4.22E-05
TMA	2.58E-04	20	1.03E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.107	
[L]/[M]	2.09		

V.2.3.3 Sistema ETF-Cu(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Cu(ClO_4)_2$	9.60E-04	10	1.92E-04
ETF	2.68E-04	20	1.07E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.105	
[L]/[M]	0.56		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Cu(ClO_4)_2$	2.40E-04	10	4.80E-05
ETF	2.68E-04	20	1.07E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.105	
[L]/[M]	2.23		

V.2.3.4 Sistema ETF-Zn(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Zn(ClO_4)_2$	8.44E-04	10	1.69E-04
ETF	2.68E-04	20	1.07E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.105	
[L]/[M]	0.64		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Zn(ClO_4)_2$	2.11E-04	10	4.22E-05
ETF	2.68E-04	20	1.07E-04
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.105	
[L]/[M]	2.54		

V.2.3.5 Sistema TMET-Cu(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Cu(ClO_4)_2$	9.60E-04	10	1.92E-04
TMET	1.04E-04	20	4.16E-05
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.106	
[L]/[M]	0.22		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.232	10	4.64E-02
$Cu(ClO_4)_2$	1.04E-04	10	2.08E-05
TMET	1.04E-04	20	4.16E-05
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.106	
[L]/[M]	2.00		

V.2.3.6 Sistema TMET-Zn(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.5	10	1.00E-01
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Zn(ClO_4)_2$	8.44E-04	10	1.69E-04
TMET	2.08E-04	20	8.32E-05
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.105	
[L]/[M]	0.49		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
$NaClO_4$	0.3	10	6.00E-02
$HClO_4$	0.0232	10	4.64E-03
$Zn(ClO_4)_2$	2.11E-04	10	4.22E-05
TMET	2.08E-04	20	8.32E-05
TOTAL		50	
FORÇA IÒNICA		0.065	
[L]/[M]	1.97		

V.2.3.7 Sistema L-Cu(II) on L = BXI, BTI o BMI

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		0	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.2	5	2.38E-02
$CuCl_2$	2.44E-05	5	2.90E-06
LLIGAND	1.03E-04	1	2.45E-06
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.102	
[L]/[M]	0.85		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		3	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.2	5	2.38E-02
$CuCl_2$	2.44E-05	2	2.90E-06
LLIGAND	1.03E-04	1	2.45E-06
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.102	
[L]/[M]	2.11		

V.2.3.8 Sistema L-Zn(II) on L = BXI, BTI o BMI

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		0	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.2	5	2.38E-02
$ZnCl_2$	2.44E-05	5	2.90E-06
LLIGAND	1.03E-04	1	2.45E-06
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.102	
[L]/[M]	0.85		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		3	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.86E-02
HCl	0.2	5	2.38E-02
$ZnCl_2$	2.44E-05	2	2.90E-06
LLIGAND	1.03E-04	1	2.45E-06
TOTAL		42	
FORÇA IÒNICA		0.102	
[L]/[M]	2.09		

V.2.3.9 Sistema CQ-Cu(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		5	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.50E-02
HCl	0.2	5	2.27E-02
$CuCl_2$	2.44E-05	1	5.55E-06
CQ	9.95E-05	2	4.52E-06
TOTAL		44	
FORÇA IÒNICA		0.098	
[L]/[M]	0.81		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		2	
etanol		20	
NaCl	0.3	11	7.50E-02
HCl	0.2	5	2.27E-02
$CuCl_2$	2.44E-05	4	2.22E-06
CQ	9.95E-05	2	4.52E-06
TOTAL		44	
FORÇA IÒNICA		0.098	
[L]/[M]	2.04		

V.2.3.10 Sistema CQ-Zn(II)

Valoració 1

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		2	
etanol		12	
NaCl	0.3	11	9.71E-02
HCl	0.2	2	1.18E-02
$ZnCl_2$	2.44E-05	2	1.44E-05
CQ	9.95E-05	5	1.46E-05
TOTAL		34	
FORÇA IÒNICA		0.109	
[L]/[M]	1.02		

Valoració 2

REACTIU	[C] inicial (M)	V (ml)	[C] final (M)
aigua		3	
etanol		12	
NaCl	0.3	11	9.71E-02
HCl	0.2	2	1.18E-02
$ZnCl_2$	2.44E-05	1	7.18E-06
CQ	9.95E-05	5	1.46E-05
TOTAL		34	
FORÇA IÒNICA		0.109	
[L]/[M]	2.09		

V.3. Síntesi dels derivats iodats dels lligands HBX, HBT i BM

Totes les reaccions de iodació aquí descrites s'han dut a terme en absència de llum i utilitzant dissolvents previament destil·lats.

2-(benzo[*d*]oxazol-2-il)-4-iodofenol (HBXI). NaI (0.430 g, 2.86 mmol) s'afegeix sobre una solució metanòlica (15 ml) de 2-(2-hidroxifenil)benzoxazol (0.505 g, 2.39 mmol). La solució resultant es deixa sota agitació durant 5 min. a temperatura ambient. Tot seguit es prepara una solució de Cloramina T (N-cloro-p-toluensulfonamida, CAT) (1.30 g, 5.73 mmol) en el mínim volum de MeOH i s'afegeix gota a gota a la solució reaccionant. L'addició provoca un canvi de coloració de groc a granatós, que va desapareixent a l'afegir la darrera gota d'agent oxidant. La mescla es deixa reaccionar durant 2 h a temperatura ambient. Després d'aquest temps, s'evapora el dissolvent i el residu es renta amb abundant H_2O obtenint-se un sòlid groc pàl·lid. Aquest sòlid es dissol en la mínima quantitat de MeOH calent i s'addiciona gota a gota éter dietílic fins que la solució esdevé tèrbola. Aquesta suspensió es deixa a -4ºC durant 12h. Passat aquest temps, s'obté un sòlid blanc cristal·lí que es filtra i es deixa assecar al buit

donant lloc al producte **HBXI** (0.61 g, 76%). ^{1}H NMR ($CHCl_3$-d, 300 MHz): δ 6.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.64 (m, 1H), 7.69 (dd, J = 8.9 Hz, J = 1.8 Hz, 1H), 7.74 (m, 1H), 8.33 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 11.5 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CHCl_3$, 75.48 MHz) δ 80.5, 110.7, 112.8, 119.7, 119.4, 125.2, 125.8, 135.3, 139.7, 141.9, 149.1, 158.3, 161.3. MS (+ESI-MS) *m/z* (intensitat relativa) = 338.2 ($[L+H]^+$, 100). Anal. Calc. (exp.) per a $C_{13}H_8INO_2$: C, 46.32 (46.20); H, 2.39 (2.29); N, 4.15 (4.03). Cristalls adients per a difracció de raigs X s'han obtingut per evaporació lenta d'una solució saturada de **HBXI** en acetona/metanol.

2-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-iodofenol (HBTI). Una mescla de NaI (0.390 g, 2.64 mmol), 2-(2-hidroxiphenil)benzotiazol (0.500 g, 2.19 mmol) i CAT (1.20 g, 5.27 mmol) es dissolen en 30 ml de MeOH i es deixa en agitació durant 2h a temperatura ambient. Tot seguit, s'evapora el dissolvent i el residu es renta amb 100 ml d'aigua. El sòlid groc que resulta després d'aquest procés és recristal·litzat amb 15 ml de CH_3CN obtenint **HBTI** en forma de sòlid groc pàl·lid (0.47 g, 61%). ^{1}H NMR ($CHCl_3$-d, 300 MHz): δ 6.87 (d, J = 9.1Hz, 1H), 7.43 (ddd, J = 7.3 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.50 (ddd, J = 7.3 Hz, J = 1.4 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 9.1 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 7.90(dd, J = 8.4Hz, J = 1.09Hz, 1H), 7.91 (d, J = 2.1Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.09 Hz, 1H), 12.2 (s, 1H) ^{13}C NMR ($CHCl_3$, 75.48 MHz) δ (ppm)**:** 80.2, 120.1, 121.5, 122.2, 122.3, 125.8, 126.2, 126.8, 132.4, 136.3, 140.9, 156.6, 167.5. MS (+ESI-MS) *m/z* (intensitat relativa) = 354.2 ($[L+H]^+$, 100). Anal. Calc. (exp.) per a $C_{13}H_8INSO$: C, 44.21 (44.17); H, 2.28 (2.10); N 3.97 (3.80) S 9.08 (8.89). Cristalls adients per a difracció de raigs X s'han obtingut per evaporació lenta d'una solució saturada de **HBTI** en acetona/metanol.

2-(*1H*-benzoimidazol)-4-iodoaniline (BMI). 2-(2-aminofenil)-*1H*-benzimidazol (0.492 g, 2.34 mmol) es dissol en CH_2Cl_2 anhidre i àcid trifluoroacètic (TFA) (100 μl). Una solució de $[Ipy_2]BF_4$ (1.04 g, 2.81 mmol) en CH_2Cl_2 s'addiciona gota a gota i s'observa que la mescla esdevé d'un color rosat. Aquesta es deixa sota agitació a temperatura ambient durant 2h, resultant un sòlid blanc que es filtra, es renta amb 10 ml de solució aquosa de tiosulfat sòdic 5% (10 ml) i 25 ml d'aigua i es deixa assecar al buit durant tota una nit. **BMI** 0.49 g (62%). ^{1}H NMR (acetona-d_4, 300 MHz): δ 8.33 (d, J = 1.82 Hz, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.51 (dd, J = 1.82 Hz, J = 8.40 Hz, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.74 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H) ^{13}C NMR (acetona, 75.48 MHz) δ (ppm)**:** 75.2, 111.7, 114.2, 115.1, 119.6, 122.7, 123.8, 136.0, 139.5, 144.4, 144.5, 149.1, 152.1. MS (+ESI-MS) *m/z* (intensitat relativa) = 336.2 ($[L+H]^+$, 100). Anal. Calc. (exp.) per a $C_{13}H_{10}IN_3$: C, 46.59 (45.37); H, 3.01 (2.86); N 12.54 (11.98). Cristalls adients per a difracció de raigs X s'han obtingut per evaporació lenta d'una solució concentrada de **BMI** en acetona.

V.4. Síntesi dels complexos ML_2 (M = Cu(II) or Zn(II); L = BXI, BTI, BMI)

V.4.1. Procediment general per a la síntesi de ML_2 (M = Cu(II) or Zn(II); L = BXI, BTI). Una solució que conté dos equivalents del corresponent lligand (**HBXI**, **HBTI**) en el mínim volum de MeOH, s'afegeix a una solució de MCl_2 (M = Cu or Zn) en MeOH (2-5 ml). La mescla reaccionant es deixa sota agitació durant 10 min. i s'afegeixen unes 5 gotes de Et_3N. La solució resultant s'agita durant 1h i el sòlid que s'obté, s'aïlla i es purifica d'acord amb el procediment que es descriu a continuació per a cadascun d'ells.

[Cu(BXI)$_2$]. $CuCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.025 g, 0.15 mmol) en MeOH (5 ml) i **HBXI** (0.10 g, 0.29 mmol) en MeOH (25 mL) es barregen com es detalla en el procediment general. La mescla resultant, que presenta un color verd fosc, es deixa a -30ºC durant 12h. El sòlid de color marró fosc que s'obté es filtra, es renta amb MeOH i s'asseca al buit. S'obté **[Cu(BXI)$_2$]** (0.089 g, 81%). IQ-MS (negatiu): *m/z* 735.1 {M^-} Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{14}CuI_2N_2O_4$: C, 42.44 (42.07); H, 1.92 (1.83); N, 3.81 (3.63).

[Zn(BXI)$_2$]. $ZnCl_2$ (0.019 g, 0.14 mmol) en MeOH (5 ml) i **HBXI** (0.094 mg, 0.28 mmol) en MeOH (25 ml) es barregen com es descriu en el procediment general. El sòlid groc resultant és filtrat, rentat amb MeOH calent i assecat al buit donant lloc a un polsim groc pàl·lid que correspon al complex **[Zn(BXI)$_2$]** (0.093 g, 90%). IQ-MS (negatiu): *m/z* 735.7 {M^-}. Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{14}ZnI_2N_2O_4$: C, 42.34 (42.21); H, 1.91 (1.82); N, 3.80 (3.65).

[Cu(BTI)$_2$]. $CuCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.036 g, 0.21 mmol) en MeOH (5 ml) i **HBTI** (0.15 g, 0.42 mmol) en MeOH (25 ml) es barregen com es descriu en el procediment general. S'obté un sòlid verd en suspensió, que es deixa a -30ºC durant 12h. El sòlid resultant es filtra, es renta amb MeOH i es deixa assecar al buit donant lloc a un polsim marró fosc que correspon al complex **[Cu(BTI)$_2$]** (0.121 g, 75%). IQ-MS (negatiu): *m/z* 766.7 {M^-}. Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{14}CuI_2N_2O_2S_2$: C, 40.67 (40.39); H, 1.84 (1.76); N, 3.65 (3.52); S, 8.35 (8.10)

[Zn(BTI)$_2$]. $ZnCl_2$ (0.029 g, 0.21 mmol) en MeOH (5 ml) i **HBTI** (0.15 g, 0.42 mmol) in MeOH (25 ml) es barregen com es detalla en el procediment general. Com a resultat s'obté un sòlid groc que es filtra, es renta amb MeOH i s'asseca al buit donant lloc a un polsim groc pàl·lid que correspon al complex **[Zn(BTI)$_2$]** (0.14 g, 87%). IQ-MS (negatiu): 767.9 {M^-}. Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{14}ZnI_2N_2O_2S_2$: C, 40.57 (40.28); H, 1.83 (1.74); N, 3.64 (3.48); S, 8.50 (7.97)

V.4.2 Procediment general per a la síntesi de ML_2 (M = Cu(II) or Zn(II); L = BMI). A una solució que conté dos equivalents del corresponent lligand (**BMI**) en el mínim volum de CH_3CN, s'afegeix a una solució de MCl_2 (M = Cu or Zn) en CH_3CN (2-5 ml). La solució resultant s'agita durant 2h i es deixa durant 1h a -30ºC per assegurar la precipitació. El sòlid que s'obté, s'aïlla i es purifica d'acord amb el procediment que es descriu a continuació per a cadascun dels complexos.

[Cu(BMI)$_2$]Cl$_2$. $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.038 g, 0.22 mmol) en CH_3CN (5 mL) i BMI (0.15 g, 0.45 mmol) en CH_3CN (25 mL) es barregen com s'ha descrit anteriorment en el procediment general. Com a resultat, s'obté una solució verda fosca que es deixa durant 1h a -30ºC. El precipitat obtingut és filtrat, rentat amb CH_3CN i assecat al buit donant lloc a un polsim verd fosc que es caracteritza com al complex **[Cu(BMI)$_2$]Cl$_2$** (0.141 g, 80%). +ESI-MS *m/z* (intensitat relativa): 733.3 ([M – 2Cl]$^+$, 100) Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{20}CuI_2N_6Cl_2$: C, 38.80 (38.25); H, 2.51 (2.30); N, 11.44 (11.11)

[Zn(BMI)$_2$]Cl$_2$. $ZnCl_2$ (0.030 g, 0.22 mmol) in CH_3CN (5 mL) i BMI (0.15 g, 0.45 mmol) in CH_3CN (25 mL) es barregen com es detalla en el procediment general. La suspensió resultant es manté durant 1h a -30ºC. El precipitat obtingut es filtra, es renta amb CH_3CN calent i s'asseca al buit. El sòlid blanquinós obtingut es caracteritza com al complex **[Zn(BMI)$_2$]Cl$_2$** (0.164 g, 92%). +ESI-MS *m/z* (intensitat relativa): 734.4 ([M – 2Cl]$^+$, 100). Anal. Calc. (exp.) per a $C_{26}H_{20}ZnI_2N_6Cl_2$: C, 38.72 (38.40); H, 2.50 (2.48); N, 10.42 (10.11)

V.5. Formació de les fibres amiloides

Les proteïnes Aβ_{1-42} i amilina (també coneguda amb les sigles IAPP de l'anglès *Islet amyloid polypeptide*) es comercialitzen en lots liofilitzats. Previ a qualsevol assaig, cal fer un tractament per homogeneïtzar les mostres i assegurar l'estat monomèric de la proteïna a l'inici de qualsevol experiment. Aquest protocol consisteix en dissoldre el pèptid en hexafluoroisopropanol (HFIP) i posteriorment evaporar a sequetat. El pèptid resultant s'ha de conservar a -80ºC.

Per formar fibres amiloides, es dissol una quantitat coneguda de pèptid en dimetilsulfòxid (DMSO) i s'afegeix un volum determinat de solució tampó per arribar a una concentració final 100 mM de pèptid i a un 2.5% en volum de DMSO.

En el cas del pèptid Aβ_{1-42} , s'utilitza tampó fosfat salí (PBS, pH 7.4), en canvi per a l'amilina NaAc (10 mM, pH 5.5). Les solució obtinguda s'agita una mica i s'incuba a temperatura ambient durant 24h. La presència de fibres es comprova per microscòpia de transmissió electrònica (TEM).

La proteïna transtirretina (TTR) és també una proteïna amiloidogènica que ha estat utilitzada com a model inicial per estudiar la capacitat intercaladora dels nostres compostos. La seva naturalesa amiloidogènica, fa que s'hagi de treballar amb una proteïna mutant de TTR coneguda com a Y78F. 25.75 mg d'aquesta proteïna es dissolen en 6 ml de PBS (pH 7.4) , es quantifica espectrofotomètricament a partir del valor d'absorbància a 280 nm i utilitzant el coeficient d'extinció molar corresponent a la TTR Y78F (ε_{280nm} = $1.74 \cdot 10^{10}$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$). 2 ml d'aquesta solució de TTR es barregen amb 2 ml de solució tampó acetat (pH 4.20) i es deixa incubar tota una nit a 37ºC. Al dia següent s'observa un precipitat blanc.

V.6. Estudi de la capacitat intercalant dels lligands mitjançant fluorescència

V.6.1 Mesures de fluorescència

Les mesures de fluorescència dels lligands estudiats incubats amb la proteïna TTR mutant Y78F, s'han dut a terme mitjançant un espectrofluorímetre Fluoromax-2 a temperatura ambient. Les solucions stock de lligands es preparen en etanol. Les concentracions utilitzades s'indiquen a la Figura 5.1.

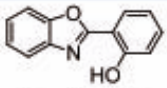
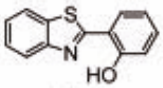
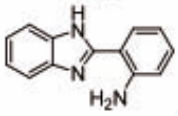
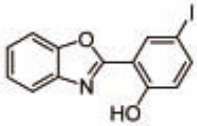
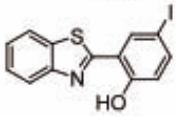
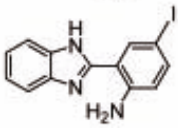
ID	Molècula	Fòrmula molecular / PM	mg pesats	[mM] EtOH
a		$C_{13}H_9NO_2$ 211.22	0.494	2.35
b		$C_{13}H_9NOS$ 227.28	0.594	2.63
c		$C_{13}H_{11}N_3$ 209.25	0.531	2.55
d		$C_{13}H_8INO_2$ 337.11	0.655	6.48
e		$C_{13}H_8INOS$ 353.18	0.534	1.51
f		$C_{13}H_{10}IN_3$ 335.14	0.460	1.37

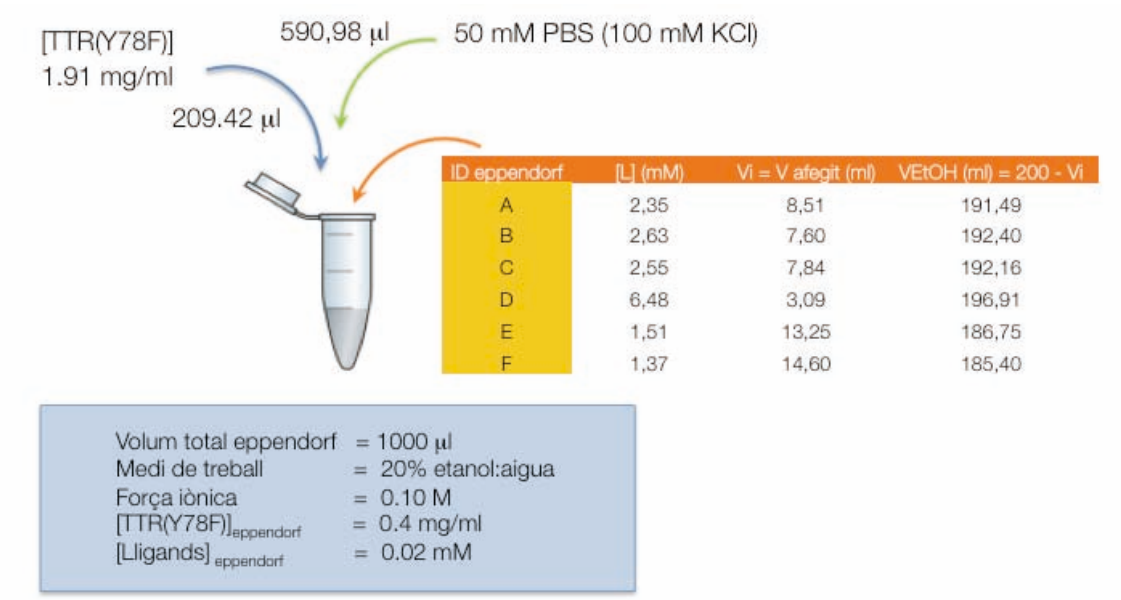
Figura 5.1. Taula on es mostren els compostos (a) HBX, (b) HBT, (c) BMI, (d) HBXI, (e) HBTI i (f) BMI així com les concentracions utilitzades per als assajos bioquímics.

La concentració final de proteïna utilitzada és de 0.4 mg/ml, aquesta s'incuba durant 24h a 37ºC amb una concentració final de lligand de 0.02 mM. El medi de treball és una solució 20% etanol:aigua. A la Figura 5.2 es mostra un esquema on s'indiquen els volums i les concentracions de les solucions que s'afegeixen a cadascun dels eppendorfs.

Un cop acabat el procés d'incubació, cada eppendorf es centrifuga i es renta amb 100 μl de tampó 50 mM PBS (100 mM KCl; pH 7.4). Aquest procés es repeteix dues vegades més i finalment les fibres es resuspenen amb 1000 μl de 50 mM PBS.

Per a cada lligand lliure s'enregistra l'espectre d'emissió a pH = 7.4, a la longitud d'ona corresponent a la màxima absorbància. De la mateixa manera es procedeix amb les mostres de proteïna incubades amb els lligands estudiats. En aquest cas, s'utilitzen dos tipus de fluoròfors, uns extrínsecs que corresponen als lligands associats a la proteïna per enllaços covalents o no covalents, i els intrínsecs que són els aminoàcids aromàtics que conté la proteïna (Tyr, Trp, Phe). En aquest cas es mesura la fluorescència a 280 nm de l'aminoàcid Tyr.

La informació que proporciona l'espectroscòpia de fluorescència es basa en la interacció que té lloc entre la proteïna i el lligand, ja que canvis en la fluorescència d'aquests lligands es poden atribuir a canvis en el seu entorn, ja sigui canvis en el solvent o en la proximitat d'aminoàcids.



ID eppendorf	[L] (mM)	Vi = V afegit (ml)	VEtOH (ml) = 200 - Vi
A	2,35	8,51	191,49
B	2,63	7,60	192,40
C	2,55	7,84	192,16
D	6,48	3,09	196,91
E	1,51	13,25	186,75
F	1,37	14,60	185,40

Figura 5.2. Esquema on s'indica el procediment de preparació dels eppendorfs. La nomenclatura dels lligands segueix (A) HBX, (B) HBT, (C) BMI, (D) HBXI, (E) HBTI i (F) BMI.

Pel que fa a les mesures de fluorescència realitzades amb amilina, s'han dut a terme amb un espectrofluorímetre Varian, Cary Eclipse a 293K. L'amplada d'escletxa s'ha fixat a 2.5 nm x 5 nm per a l'excitació i l'emissió respectivament. Les fibres d'amilina preparades segons s'indica en l'apartat V.5, es dilueixen 10 vegades en tampó acetat 10 mM (pH 5.5) que conté el lligand a una concentració de 0.1 mg/ml. Els espectres de fluorescència es comencen a enregistrar passats 5 min. Controls positius d'unió es realitzen amb el compost ThT sota les mateixes condicions, excitant a longituds d'ona 440 nm i lenregistrant l'espectre d'emissió en l'interval de longituds d'ona comprès entre 460 i 560 nm.

V.6.2 Microscòpia de fluorescència

El microscopi de fluorescència es basa en el fet que hi ha molècules que emeten fluorescència quan són excitades per l'absorció de radiació a una determinada longitud d'ona, quan aquestes són incubades amb alguna mostra no fluorescent poden actuar com a fluoròfors marcadors. En el nostre cas, les fibres amiloides no presenten fluorescència en l'interval de longituds d'ona en les quals permet excitar el microscopi de fluorescència (515-566 nm). Així, incubant les molècules font d'estudi amb les fibres amiloides i observant la mescla en un microscopi de fluorescència, es pot avaluar si els compostos proposats en aquest treball interaccionen amb les fibres del pèptid $A\beta_{1-42}$ i d'amilina. Atès que es coneix que el compost ThT és un dels agents de tinció més emprats per caracteritzar fibres amiloides, aquest s'ha utilitzat com a control positiu. El protocol seguit per a la preparació de les mostres ha estat el següent:

1. S'incuba la mostra amb una dissolució que contingui el lligand a estudiar durant 10 min.
2. Es diposita la barreja a sobre d'un portaobjectes.
3. Es col·loca un cobreobjectes al damunt de la mostra i es segella

Inicialment es preparen solucions etanòliques de cadascun dels lligands a una concentració de 1 mg/ml. Les fibres madures formades segons el procés detallat a l'apartat V.5, s'incuben amb el volum adient de lligand, fins una relació final de 4:1 (v/v). Aquesta mescla es deixa durant 10 min incubant a temperatura ambient. Tot seguit, es centrifuga i es renta amb 80 μl d'aigua bidestil·lada. Aquest procés es repeteix dos cops més. Un cop rentades, les fibres es resuspenen en 15 μl d'aigua bidestil·lada intentant homogeneïtzar al màxim la solució. 8 μl d'aquesta mescla es dipositen en un portaobjectes, es fixen amb un cobreobjectes i es segella per poder fer les mesures de fluorescència.

Per comprovar que els lligands únicament donen fluorescència en enllaçar-se a fibres amiloides, es realitzen controls negatius amb una proteïna de naturalesa no amiloidogènica: sèrum d'albúmina bovina (BSA).

Les imatges de microscòpia de fluorescència es realitzen amb un microscopi Leica DMBR equipat amb lents de 40x i 100x augments. El temps d'exposició es fixa a 2.53 s. El filtre d'excitació comprèn l'interval de longituds d'ona de 515 a 566 nm i l'emissió resultant es recull a longituds d'ona per sobre de 580 nm.

V.7. Capacitat coordinant dels lligands en presència del pèptid $A\beta_{1-40}$ incubat amb Cu(II) i Zn(II). Assajos de turbidimetria

Les mesures de la turbidesa a una determinada longitud d'ona indiquen l'agregació d'una mostra. Com major és el valor d'absorbància, més agregació presenta la mostra. En aquest treball, les tècniques turbidimètriques han permès: (1) estudiar la capacitat dels lligands HBXI, HBTI i BMI d'inhibir la formació de fibres del pèptid $A\beta_{1-40}$; (2) comprovar que la presència dels ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) en solucions que contenen pèptid $A\beta_{1-40}$ indueix la formació de fibres, i (3) estudiar la capacitat coordinant dels lligands HBXI, HBTI i BMI en un medi on el pèptid $A\beta_{40}$ pot competir per enllaçar als ions Cu(II) i Zn(II).

Els assajos turbidimètrics es realitzen amb el pèptid $A\beta_{1-40}$ sintètic que comercialitza Biopeptide Co. Inc. Aquest es prepara en aigua Milli-Q a una concentració aproximadament de 200 μM. Per assegurar l'estat monomèric de la proteïna a l'inici de qualsevol experiment, la solució es sonica tres vegades i es filtra a través d'una xeringa connectada a un filtre amb un diàmetre de porus 0.2 μm (Millipore) per eliminar possibles agregats. La quantificació de pèptid es realitza espectrofotomètricament aplicant la llei de Lambert-Beer a una longitud d'ona de 276 nm i coneixent el ε de l'espècie $A\beta_{40}$ monomèrica (1450 $cm^{-1}\cdot M^{-1}$). Dues solucions tampó 20 μM d' àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfònic (HEPES) es preparen amb aigua bidestil·lada i 150 μM de NaCl a valors de pH 6.6 i 7.4. Aquestes solucions es tracten durant tota una nit amb 5% (p/v) de Chelex i es filtren a través d'un filtre Millipore de 0.2 μm de porus. Solucions estàndard de Cu(II) i Zn(II) es preparen diluint solucions de concentració coneguda (1000 ppm) d'aquests ions metàl·lics amb una solució tampó HEPES de pH 6.6 i 7.4, respectivament fins a una concentració final de 200 μM. Les solucions dels diferents lligands avaluats (HBXI, HBTI, BMI, EDTA, CQ, PIB i ThT) són preparades en etanol a una concentració 200 μM.

L'assaig turbidimètric es duu a terme de tres maneres diferents. En totes elles s'addiciona 25 μM de pèptid $A\beta_{1-40}$ a una solució al 25% d'etanol, que conté: (1) lligand en una concentració 50 μM; (2) metall en una concentració 25 μM; i (3) lligand (50 μM) + metall (25 μM). Els assajos en absència de metall es duen a terme a pH 6.6. Totes les solucions, un cop preparades, són incubades durant tota una nit a 37ºC amb constant agitació per tal d'afavorir l'agregació del pèptid $A\beta_{1-40}$ S'enregistra l'absorbància a 405 nm per quadruplicat, agitant la mostra abans de cada mesura. L'espectrofotòmetre utilitzat ha estat un Varian Cary-100.

V.8. Cristal·lització del catió ThT^+

El compost comercial (ThT)Cl es recristal·litza amb ACN. L'addició d'una solució aquosa saturada de KI (5 ml) a una solució aquosa (20 ml) de (ThT)Cl (0.600 g, 1.88 mmol) dóna lloc a la formació d'un sòlid groc molt fi que es filtra, es renta amb 10 ml d'aigua i s'asseca al buit durant tota una nit. Les dades obtingudes per espectrometria de masses mostren la presència de ThT^+ exclusivament. MS (+ESI-MS) *m/z* (intensitat relativa) = 283.1 ($[ThT]^+$, 100).

Una solució saturada en $CHCl_3$ del sòlid groc obtingut es deixa evaporar lentament a atmosfera oberta. Al cap de 24h apareixen uns cristalls vermells adequats per a difracció de raigs X que es caracteritzen com a $(ThT)_2I_4 \cdot 2CHCl_3$ (1). Separats els cristalls vermells de la solució, si aquesta es continua evaporant, passada una setmana aproximadament, s'obtenen uns cristalls grocs que corresponen a $(ThT)I \cdot CHCl_3$ (2).

V.9. Programari utilitzat

La taula que es mostra a continuació és un recull d'alguns programes que han estat utilitzats per a realitzar aquesta tesi.

PROGRAMA	Descripció	entorn	web
pHab2000	Determinació de les constants d'acidesa i d'estabilitat a partir de dades espectrofotomètriques		http://www.chim1.unifi.it/group/vacsab/phab.htm
Spekwin32	Tractament d'espectres de fluorescència		http://www.effemm2.de/spekwin/index_en.html
Marvinsketch MarvinView MarvinSpace	Conjunt d'aplicacion en Java per a dibuixar molècules, visualitzar-les i predir propietats fisicoquímiques		http://www.chemaxon.com/products.html
Instant JChem	Aplicació en Java que permet filtrar una base de dades de molècules en base als criteris que estableixi l'usuari		http://www.chemaxon.com/product/ijc.html
Mercury 2.2	Visualització d'estructures cristal·lines i càlcul de distàncies, angles i angles diedres		http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/mercury/
Pymol	Visualització d'estructures 3D de proteïnes		http://pymol.org/
Mollegro	Visualització d'estructures 3D de proteïnes		http://www.molegro.com/products.php
Avogadro	Visualització d'estructures cristal·lines i càlcul de distàncies, angles i angles diedres. Possibilitat de realitzar càlculs relacionats amb la flexibilitat d'una molècula		http://avogadro.openmolecules.net/wiki/Main_Page
iMol	Aplicació Java per a la visualització de molècules i proteïnes		http://www.pirx.com/iMol/
ClogP	Càlcul del paràmetre ClogP		http://www.biobyte.com/index.html
iMass	Calculadora de pesos moleculars i d'anàlisis elementals. Permet obtenir patrons isotòpics teòrics de masses		http://home.datacomm.ch/marvin/iMass/
MestRec v.5.0	Processador de FIDs experimentals (en una o dues dimensions) obtinguts amb espectròmetres Varian, Bruker, JEOL i altres. Permet realitzar transformacions de Fourier, correccions de fase i ampliacions de zones dels espectres resultants		http://www.mestrec.com/

VI. BIBLIOGRAFIA

(1) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333-66.
(2) Alzheimer, A. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 7.
(3) O'Brien, C. *Science* **1996**, *273*, 28.
(4) Gurwitz, D. *Lancet* **1997**, *350*, 298.
(5) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Scazufca, M. *Lancet* **2005**, *366*, 2112-7.
(6) Cummings, J. L.; Cole, G. *JAMA* **2002**, *287*, 2335-8.
(7) Brunnstrom, H.; Gustafson, L.; Passant, U.; Englund, E. *Arch. Gerontol. Geriat.* **2008**.
(8) Kalaria, R. N.; Maestre, G. E.; Arizaga, R.; Friedland, R. P.; Galasko, D.; Hall, K.; Luchsinger, J. A.; Ogunniyi, A.; Perry, E. K.; Potocnik, F.; Prince, M.; Stewart, R.; Wimo, A.; Zhang, Z. X.; Antuono, P. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 812-26.
(9) Katzman, R. *Alzheimers Dement.* **2008**, *4*, 378-80.
(10) Wilson, R. S. *Neurology* **2008**, *71*, 874-5.
(11) Sawada, H.; Ibi, M.; Kihara, T.; Urushitani, M.; Akaike, A.; Shimohama, S. *J. Neurosci. Res.* **1998**, *54*, 707- 19.
(12) Tang, M.-X.; Jacobs, D.; Stern, Y.; Marder, K.; Schofield, P.; Gurland, B.; Andrews, H.; Mayeux, R. *Lancet* **1996**, *348*, 429-432.
(13) Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741-66.
(14) Shastry, B. S.; Giblin, F. J. *Brain Res. Bull.* **1999**, *48*, 121-7.
(15) Cai, X. D.; Golde, T. E.; Younkin, S. G. *Science* **1993**, *259*, 514-6.
(16) Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McConlogue, L.; Hung, A. Y.; Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Lieberburg, I.; Selkoe, D. J. *Nature* **1992**, *360*, 672-4.
(17) Isacson, O.; Seo, H.; Lin, L.; Albeck, D.; Granholm, A. C. *Trends Neurosci* **2002**, *25*, 79-84.
(18) Hoe, H.-S.; Rebeck, G. W. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 2263-2271.
(19) Graves, A. B.; White, E.; Koepsell, T. D.; Reifler, B. V.; van Belle, G.; Larson, E. B.; Raskind, M. *Am. J. Epidemiol.* **1990**, *131*, 491-501.
(20) Sando Sigrid, B.; Melquist, S.; Cannon, A.; Hutton, M.; Sletvold, O.; Saltvedt, I.; White Linda, R.; Lydersen, S.; Aasly, J. *Int. J. Geriatr. Psych.* **2008**, *23*, 1156-62.
(21) Laurin, D.; Verreault, R.; Lindsay, J.; MacPherson, K.; Rockwood, K. *Arch. Neurol.* **2001**, *58*, 498- 504.
(22) Maher, P. A.; Schubert, D. R. *Exp. Rev. Neurotherap.* **2009**, *9*, 617-630.
(23) Strachan, M. W. J.; Reynolds, R. M.; Frier, B. M.; Mitchell, R. J.; Price, J. F. *Brit. Med. Bull.* **2008**, *88*, 131-146.
(24) Xu, W.; Qiu, C.; Gatz, M.; Pedersen, N. L.; Johansson, B.; Fratiglioni, L. *Diabetes* **2008**, *58*, 71-77.
(25) Xu, W. L.; Strauss, E.; Qiu, C. X.; Winblad, B.; Fratiglioni, L. *Diabetologia* **2009**, *52*, 1031-1039.
(26) Becaria, A.; Lahiri, D. K.; Bondy, S. C.; Chen, D.; Hamadeh, A.; Li, H.; Taylor, R.; Campbell, A. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *176*, 16-23.
(27) Miu, A. C.; Benga, O. *J. Alzheimer's Dis.* **2006**, *10*, 179-201.
(28) Roland Jakob-Roetne, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3030-3059.
(29) Glenner, G. G.; Wong, C. W.; Quaranta, V.; Eanes, E. D. *Appl. Pathol.* **1984**, *2*, 357-69.
(30) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353-6.
(31) Selkoe, D. J. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 447-53.
(32) Thinakaran, G.; Koo, E. H. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29615-29619.
(33) Schmidt, C.; Lepsverdize, E.; Chi, S. L.; Das, A. M.; Pizzo, S. V.; Dityatev, A.; Schachner, M. *Mol. Psychiatr.* **2008**, *13*, 953-969.
(34) Monsonego, A.; Maron, R.; Zota, V.; Selkoe, D. J.; Weiner, H. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*,10273-8.
(35) Bitan, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 330-5.
(36) Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T., Jr. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-7.
(37) Yu, L.; Edalji, R.; Harlan, J. E.; Holzman, T. F.; Pereda Lopez, A.; Labkovsky, B.; Hillen, H.; Barghorn, S.; Ebert, U.; Richardson, P. L.; Miesbauer, L.; Solomon, L.; Bartley, D.; Walter, K.; Johnson, R. W.; Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1870-1877.
(38) Stefani, M.; Dobson, C. M. *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678-699.
(39) Meyer-Luehmann, M.; Spires-Jones, T. L.; Prada, C.; Garcia-Alloza, M.; de Calignon, A.; Rozkalne, A.; Koenigsknecht-Talboo, J.; Holtzman, D. M.; Bacskai, B. J.; Hyman, B. T. *Nature* **2008**, *451*, 720-724.
(40) Monji, A.; Yoshida, I.; Tashiro, K. i.; Hayashi, Y.; Matsuda, K.; Tashiro, N. *Neurosci. Lett.* **2000**, *278*, 81-84.
(41) Sipe, J. D.; Cohen, A. S. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88-98.

(42) Sunde, M.; Blake, C. *Adv. Protein. Chem.* **1997**, *50*, 123-59.
(43) Dobson, C. M. *Nature* **2003**, *426*, 884-890.
(44) Selkoe, D. J. *Nature* **2003**, *426*, 900-904.
(45) Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1487-99.
(46) Luhrs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Dobeli, H.; Schubert, D.; Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17342-7.
(47) LeVine, H., III *Methods in Enzymology* **1999**, *309*, 274-284.
(48) Vassar, P. S.; Culling, C. F. *Arch. Pathol.* **1959**, *68*, 487-98.
(49) LeVine, H., 3rd *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404-10.
(50) Raj, C. R.; Ramaraj, R. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 752-9.
(51) Ilanchelian, M.; Ramaraj, R. *J. Photoch. Photobio., A.* **2004**, *162*, 129-137.
(52) Groenning, M.; Norrman, M.; Flink, J. M.; van de Weert, M.; Bukrinsky, J. T.; Schluckebier, G.; Frokjaer, S. *J. Struct. Biol.* **2007**, *159*, 483-497.
(53) Retna Raj, C.; Ramaraj, R. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *273*, 285-290.
(54) Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 229-38.
(55) Maskevich, A. A.; Stsiapura, V. I.; Kuzmitsky, V. A.; Kuznetsova, I. M.; Povarova, O. I.; Uversky, V. N.; Turoverov, K. K. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1392-1401.
(56) Stsiapura, V. I.; Maskevich, A. A.; Kuzmitsky, V. A.; Turoverov, K. K.; Kuznetsova, I. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4829-4835.
(57) Stsiapura, V. I.; Maskevich, A. A.; Kuzmitsky, V. A.; Uversky, V. N.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 15893-15902.
(58) Krebs, M. R.; Bromley, E. H.; Donald, A. M. *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30-7.
(59) Harel, M.; Sonoda, L. K.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Rosenberry, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7856-61.
(60) Konno, T. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2148-2154.
(61) Bush, A. I.; Tanzi, R. E. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 421-32.
(62) Wang, S. S. S.; Chen, Y.-T.; Chen, P.-H.; Liu, K.-N. *Biochem. Eng. J.* **2006**, *29*, 129-138.
(63) Pellarin, R.; Caflisch, A. *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 882-892.
(64) Barnham, K. J.; Bush, A. I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 222-8.
(65) Adlard, P. A.; Bush, A. I. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *10*, 145-63.
(66) Maynard, C. J.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Li, Q. X. *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86*, 147-59.
(67) Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207-14.
(68) Bush, A. I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 184-91.
(69) Bush, A. I. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, *17*, 147-50.
(70) Faller, P.; Hureau, C. *Dalton Trans.* **2009**, 1080-94.
(71) Nordberg, A. *Lancet Neurol.* **2004**, *3*, 519-27.
(72) Nordberg, A. *Neuropsychologia* **2008**, *46*, 1636-41.
(73) Nordberg, A. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35 Suppl 1*, S46-50.
(74) Svedberg, M. M.; Hall, H.; Hellstrom-Lindahl, E.; Estrada, S.; Guan, Z.; Nordberg, A.; Langstrom, B. *Neurochem. Int.* **2009**, *54*, 347-57.
(75) Lockhart, A.; Lamb, J. R.; Osredkar, T.; Sue, L. I.; Joyce, J. N.; Ye, L.; Libri, V.; Leppert, D.; Beach, T. G. *Brain* **2007**, *130*, 2607-15.
(76) Seow, D.; Gauthier, S. *Can. J. Psychiatry* **2007**, *52*, 620-9.
(77) Musial, A.; Bajda, M.; Malawska, B. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2654-79.
(78) Munoz-Torrero, D. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2433-55.
(79) Kotani, S.; Yamauchi, T.; Teramoto, T.; Ogura, H. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 227-30.
(80) Cummings, J.; Winblad, B. *Expert Rev. Neurother.* **2007**, *7*, 1457-63.
(81) Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y.; Decker, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2905-9.
(82) Fernandez-Bachiller, M. I.; Perez, C.; Campillo, N. E.; Paez, J. A.; Gonzalez-Munoz, G. C.; Usan, P.; Garcia-Palomero, E.; Lopez, M. G.; Villarroya, M.; Garcia, A. G.; Martinez, A.; Rodriguez-Franco, M. I. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 828-841.
(83) Haruda, F. D. *Neurology* **1995**, *45*, 2116.
(84) Broe, G. A.; Grayson, D. A.; Creasey, H. M.; Waite, L. M.; Casey, B. J.; Bennett, H. P.; Brooks, W. S.; Halliday, G. M. *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 1586-91.
(85) Lim, G. P.; Yang, F.; Chu, T.; Chen, P.; Beech, W.; Teter, B.; Tran, T.; Ubeda, O.; Ashe, K. H.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 5709-14.
(86) Viswanathan, A. *Arch. Neurol.* **2009**, *66*, 520-2.
(87) Behl, C.; Davis, J.; Cole, G. M.; Schubert, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *186*, 944-50.
(88) Bowman, G. L.; Dodge, H.; Frei, B.; Calabrese, C.; Oken, B. S.; Kaye, J. A.; Quinn, J. F. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 93-8.

(89) Gray, S. L.; Anderson, M. L.; Crane, P. K.; Breitner, J. C.; McCormick, W.; Bowen, J. D.; Teri, L.; Larson, E. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2008**, *56*, 291-5.
(90) Sun, A. Y.; Wang, Q.; Simonyi, A.; Sun, G. Y. *Neuromol. Med.* **2008**, *10*, 259-74.
(91) Zaveri, N. T. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2073-80.
(92) Haque, A. M.; Hashimoto, M.; Katakura, M.; Hara, Y.; Shido, O. *J Nutr Biochem* **2008**, *19*, 619-26.
(93) Zhao, B. *Neurochem. Res.* **2009**, *34*, 630-8.
(94) Frank, B.; Gupta, S. *Ann. Clin. Psychiatry* **2005**, *17*, 269-86.
(95) Ho, L.; Chen, L. H.; Wang, J.; Zhao, W.; Talcott, S. T.; Ono, K.; Teplow, D.; Humala, N.; Cheng, A.; Percival, S. S.; Ferruzzi, M.; Janle, E.; Dickstein, D. L.; Pasinetti, G. M. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 59-72.
(96) Wang, J.; Ho, L.; Zhao, Z.; Seror, I.; Humala, N.; Dickstein, D. L.; Thiyagarajan, M.; Percival, S. S.; Talcott, S. T.; Pasinetti, G. M. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2313-20.
(97) Goel, A.; Kunnumakkara, A. B.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 787-809.
(98) Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kayed, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892-901.
(99) Luo, Y.; Smith, J. V.; Paramasivam, V.; Burdick, A.; Curry, K. J.; Buford, J. P.; Khan, I.; Netzer, W. J.; Xu, H.; Butko, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12197-202.
(100) Ringman, J. M.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M.; Masterman, D. L.; Cummings, J. L. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 131-6.
(101) Burton, C. R.; Meredith, J. E.; Barten, D. M.; Goldstein, M. E.; Krause, C. M.; Kieras, C. J.; Sisk, L.; Iben, L. G.; Polson, C.; Thompson, M. W.; Lin, X. A.; Corsa, J.; Fiedler, T.; Pierdomenico, M.; Cao, Y.; Roach, A. H.; Cantone, J. L.; Ford, M. J.; Drexler, D. M.; Olson, R. E.; Yang, M. G.; Bergstrom, C. P.; McElhone, K. E.; Bronson, J. J.; Macor, J. E.; Blat, Y.; Grafstrom, R. H.; Stern, A. M.; Seiffert, D. A.; Zaczek, R.; Albright, C. F.; Toyn, J. H. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 22992-3003.
(102) Ghosh, A. K.; Gemma, S.; Tang, J. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 399-408.
(103) Lee, V. M. *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 1039-42.
(104) Findeis, M. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 76-84.
(105) Ono, K.; Hirohata, M.; Yamada, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 444-9.
(106) Pignatello, R.; Panto, V.; Salmaso, S.; Bersani, S.; Pistara, V.; Kepe, V.; Barrio, J. R.; Puglisi, G. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 349-57.
(107) Gellermann, G. P.; Ullrich, K.; Unger, C.; Fandrich, M.; Sauter, S.; Diekmann, S. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 2037-44.
(108) Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-45.
(109) Riviere, C.; Richard, T.; Quentin, L.; Krisa, S.; Merillon, J. M.; Monti, J. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1160-7.
(110) Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberai, M.; Dumy, P.; Garcia, J. *Chembiochem* **2008**, *9*, 952-63.
(111) Bohrmann, B.; Adrian, M.; Dubochet, J.; Kuner, P.; Muller, F.; Huber, W.; Nordstedt, C.; Dobeli, H. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 232-46.
(112) Crouch, P. J.; Barnham, K. J.; Bush, A. I.; White, A. R. *Drug News Perspect.* **2006**, *19*, 469-74.
(113) Barnham, K. J.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Melov, S.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Drug Des. Rev.--Online* **2004**, *1*, 75-82.
(114) Bush, A. I. *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 1031-1038.
(115) Helmuth, L. *Science* **2000**, *290*, 1273-4.
(116) Melov, S. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 121-3; discussion 123-4.
(117) Regland, B.; Lehmann, W.; Abedini, I.; Blennow, K.; Jonsson, M.; Karlsson, I.; Sjogren, M.; Wallin, A.; Xilinas, M.; Gottfries, C. G. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2001**, *12*, 408-14.
(118) Ritchie, C. W.; Bush, A. I.; Mackinnon, A.; Macfarlane, S.; Mastwyk, M.; MacGregor, L.; Kiers, L.; Cherny, R.; Li, Q. X.; Tammer, A.; Carrington, D.; Mavros, C.; Volitakis, I.; Xilinas, M.; Ames, D.; Davis, S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1685-91.
(119) Tabira, T. *Science* **2001**, *292*, 2251-2.
(120) McCarthy, A. M. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1473-4.
(121) Adlard, P. A.; Cherny, R. A.; Finkelstein, D. I.; Gautier, E.; Robb, E.; Cortes, M.; Volitakis, I.; Liu, X.; Smith, J. P.; Perez, K.; Laughton, K.; Li, Q. X.; Charman, S. A.; Nicolazzo, J. A.; Wilkins, S.; Deleva, K.; Lynch, T.; Kok, G.; Ritchie, C. W.; Tanzi, R. E.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; Bush, A. I. *Neuron* **2008**, *59*, 43-55.
(122) Cherny, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Volitakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Neuron* **2001**, *30*, 665-76.
(123) Cahoon, L. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 356-9.
(124) Huang, X.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Cuajungco, M. P.; Gray, D. N.; Lim, J.; Moir, R. D.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7609-16.

(125) Deraeve, C.; Boldron, C.; Maraval, A.; Mazarguil, H.; Gornitzka, H.; Vendier, L.; Pitie, M.; Meunier, B. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 682-96.
(126) Deraeve, C.; Maraval, A.; Vendier, L.; Faugeroux, V.; Pitie, M.; Meunier, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 5622-5631.
(127) Boldron, C.; Van der Auwera, I.; Deraeve, C.; Gornitzka, H.; Wera, S.; Pitie, M.; Van Leuven, F.; Meunier, B. *Chembiochem* **2005**, *6*, 1976-80.
(128) Lee, J. Y.; Friedman, J. E.; Angel, I.; Kozak, A.; Koh, J. Y. *Neurobiol. Aging* **2004**, *25*, 1315-21.
(129) Cherny, R. A.; Barnham, K. J.; Lynch, T.; Volitakis, I.; Li, Q. X.; McLean, C. A.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 209-16.
(130) Storr, T.; Scott, L. E.; Bowen, M. L.; Green, D. E.; Thompson, K. H.; Schugar, H. J.; Orvig, C. *Dalton Trans.* **2009**, 3034-43.
(131) Scott, L. E.; Page, B. D.; Patrick, B. O.; Orvig, C. *Dalton Trans.* **2008**, 6364-7.
(132) Storr, T.; Merkel, M.; Song-Zhao, G. X.; Scott, L. E.; Green, D. E.; Bowen, M. L.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Schugar, H. J.; Orvig, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7453-63.
(133) Schugar, H.; Green, D. E.; Bowen, M. L.; Scott, L. E.; Storr, T.; Bohmerle, K.; Thomas, F.; Allen, D. D.; Lockman, P. R.; Merkel, M.; Thompson, K. H.; Orvig, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1716-8.
(134) Bowen, M. L.; Orvig, C. *Chem. Commun.* **2008**, 5077-91.
(135) Hrib, N. J.; Peet, N. P. *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 483-485.
(136) Bajorath, J. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 13-4.
(137) Ghose, A. K.; Herbertz, T.; Salvino, J. M.; Mallamo, J. P. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 1107-14.
(138) Hansch, C., Fujita,T. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616.
(139) Ritchie, T. J. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 813-814.
(140) Gozalbes, R.; Doucet, J. P.; Derouin, F. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2002**, *2*, 93-102.
(141) Katritzky, A. R.; Fara, D. C.; Petrukhin, R. O.; Tatham, D. B.; Maran, U.; Lomaka, A.; Karelson, M. *Curr. Top Med. Chem.* **2002**, *2*, 1333-56.
(142) Hou, T. J.; Xu, X. J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 2137-52.
(143) Gonzalez, M. P.; Toropov, A. A.; Duchowicz, P. R.; Castro, E. A. *Molecules* **2004**, *9*, 1019-33.
(144) Duchowicz, P. R.; Talevi, A.; Bruno-Blanch, L. E.; Castro, E. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7944-55.
(145) Gonzalez-Diaz, H. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1554.
(146) Greenwood, N. N., Earnshaw, A. *Chemistry of the elements, 2nd ed.*; Butterworth-Heinnemann, 1998.
(147) Huheey, J. E., Keiter, E.A., Keiter, R.L. *Inorganic Chemistry, 4th ed.,*; Harper-Collins Publishers Inc., 1993.
(148) Casas, J. S., Moreno, V., Sánchez, A., Sánchez, J.L., Sordo, J. *Química Bioinorgánica, 1ª ed.*; Ed. Síntesis, 2002.
(149) Su, C.-Y.; Liao, S.; Wanner, M.; Fiedler, J.; Zhang, C.; Kang, B.-S.; Kaim, W. *Dalton Trans.* **2003**, 189-202.
(150) ISIS/Draw *v.2.5*, Syryx Tecnologies,Inc., California; http://www.symyx.com/ (*darrer accés maig 2009*).
(151) ChemDraw *v.11.0*, CambridgeSoft; http://www.cambridgesoft.com/; (*darrer accés maig 2009*).
(152) ChemSketch *v.12.0,* ACD/Labs; http://www.acdlabs.com; (*darrer accés maig 2009*).
(153) MarvinSketch *v.5.2*, ChemAxon Kft.; Budapest, 2008; http://www.chemaxon.com (*darrer accés maig 2009*).
(154) ChemTK *v.4.0*, SageInformatics; http://www.sageinformatics.com/ChemTK (*darrer accés setembre 2003*).
(155) Wolman, Y. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 36-37.
(156) Weininger, D. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31-36.
(157) Daylight, Inc., Mission Viejo, California, U.S.A, http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smarts.html (*darrer accés març 2009*)
(158) Anon: clogP; Daylight Chemical Information Software, Inc.; www.daylight.com, (*darrer accés setembre, 2003)*
(159) Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-3717.
(160) Clark, D. E.; Pickett, S. D. *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 49-58.
(161) Clark, D. E. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 807-14.
(162) Mestres, J. *Investigador principal del grup de Quimiogenòmica de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Comunicació personal*.
(163) Leo, A., Hoekman, D. *Perspect. in Drug Discov. & Design* **2000**, *18*, 19.

(164) Barluenga, J.; González, J. M.; García-Martín, M. A.; Campos, P. J.; Asensio, G. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2058-2060.
(165) Sillén, L. G. *Acta Chem. Scand.* **1964**, *18*, 1085.
(166) Sillén, L. G., Ingri, N. *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 173.
(167) Citores, M. J., Alonso, R.M., Fernández, L.A. *Trends in Anal. Chem.* **1992**, *11*, 310.
(168) Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuhler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 251-64.
(169) Cazallas, R.; Citores, M. J.; Etxebarria, N.; Fernandez, L. A.; Madariaga, J. M. *Talanta* **1994**, *41*, 1637-44.
(170) Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. *Annali di Chimica* **1999**, *89*, 45.
(171) Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311-318.
(172) Rae, I. D. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2614.
(173) Högfeldt, E. *Stability Constants of Metal-ion Complexes. Part A: Inorganic Ligands,* ; Ed. Pergamon Press, 1983.
(174) Baes, C. F., Jr.; Mesmer, R.E. *The Hydrolysis of Cations*; R. E. Krieger Publishing Co.: Malabar, FL, 1986.
(175) Martell, A. E., Smith, R.M. *Critical Stability Constants, Vol. 1-6*; Plenum: Mew York, 1974-1989.
(176) Tyson, C. A.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3379-3386.
(177) Kas, A. K. *Trans. Met. Chem.* **1989**, *14*, 200.
(178) Leuma Yona, R.; Mazeres, S.; Faller, P.; Gras, E. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 63-6.
(179) http://www.emolecules.com.
(180) http://metamolecular.com/chemwriter/.
(181) Davis, A. M.; Keeling, D. J.; Steele, J.; Tomkinson, N. P.; Tinker, A. C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 421-39.
(182) Schuffenhauer, A.; Ruedisser, S.; Marzinzik, A. L.; Jahnke, W.; Blommers, M.; Selzer, P.; Jacoby, E. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 751-62.
(183) Alex, A. A.; Flocco, M. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1544-67.
(184) Crisman, T. J.; Bender, A.; Milik, M.; Jenkins, J. L.; Scheiber, J.; Sukuru, S. C.; Fejzo, J.; Hommel, U.; Davies, J. W.; Glick, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2481-91.
(185) Irwin, J. J. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **2008**, *Chapter 14*, Unit 14.6.
(186) Olah, M. M.; Bologa, C. G.; Oprea, T. I. *Curr. Drug Discovery Technol.* **2004**, *1*, 211-220.
(187) Oprea, T. I.; Matter, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 349-358.
(188) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
(189) van de Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. *J. Drug Target.* **1998**, *6*, 151-165.
(190) Instant JChem *2.2.1*, ChemAxon (http://www.chemaxon.com).
(191) MarvinSketch *v.5.2*, C. K. B., 2008; http://www.chemaxon.com (darrer accès maig 2009).
(192) CLOGP *v.4.0* for Windows, BioByte Corp., Claremont, USA http://www.biobyte.com.
(193) Nordberg, A. *J. Nutr. Health Aging* **2009**, *13*, 346-7.
(194) Maya, Y.; Ono, M.; Watanabe, H.; Haratake, M.; Saji, H.; Nakayama, M. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 95-101.
(195) Kung, H. F.; Newman, S.; Choi, S. R.; Oya, S.; Hou, C.; Zhuang, Z. P.; Acton, P. D.; Plossl, K.; Winkler, J.; Kung, M. P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5258-5264.
(196) Hunter, W. M.; Greenwood, F. C. *Nature* **1962**, *194*, 495-6.
(197) Greenwood, F. C.; Hunter, W. M.; Glover, J. S. *Biochem. J.* **1963**, *89*, 114-23.
(198) Bolton, A. E.; Hunter, W. M. *Biochem. J.* **1973**, *133*, 529-39.
(199) Das, T. M.; Rao, C. P.; Kalle, N.; Rissanen, K. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2003**, *42B*, 661-665.
(200) Stenson, P. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3729-38.
(201) Tong, Y. P. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2005**, *E61*, o3076-o3078.
(202) Martell A.E; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum: New York, 1974 - 1989; Vol. 1-6.
(203) Ulkuseven, B.; Kizilcikli, I.; Tavman, A.; Akkurt, B. *Rev. Inorg. Chem.* **2001**, *21*, 369-379.
(204) F. E. Mabbs, D. C. *Electron Paramagnetic Resonance of d-Transition Metal Complexes*; Elsevier: Amsterdam, 1992.

(205) Benisvy, L.; Blake, A. J.; Davies, E. S.; Garner, C. D.; McMaster, J.; Wilson, C.; Collison, D.; McInnes, E. J. L.; Whittaker, G. *Chem. Commun.* **2001**, 1824-1825.
(206) Benisvy, L.; Bill, E.; Blake Alexander, J.; Collison, D.; Davies, E. S.; Garner, C. D.; McArdle, G.; McInnes Eric, J. L.; McMaster, J.; Ross Stephanie, H. K.; Wilson, C. *Dalton Trans.* **2006**, 258-67.
(207) Hatcher, L. Q.; Hong, L.; Bush, W. D.; Carducci, T.; Simon, J. D. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8160-8164.
(208) Karr, J. W.; Szalai, V. A. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5006-5016.
(209) Tougu, V.; Karafin, A.; Palumaa, P. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1249-1259.
(210) Wu, C.; Wang, Z.; Lei, H.; Duan, Y.; Bowers, M. T.; Shea, J. E. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 718-29.
(211) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
(212) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B.* **1988**, *37*, 785.
(213) Grimme, S. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787-1799.
(214) Hetenyi, C.; van der Spoel, D. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1447-50.
(215) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781-1802.
(216) Hansson, T.; Marelius, J.; Aqvist, J. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 27-35.
(217) Aqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J. E. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 385-91.

VII. ANNEX

VII. ANNEX

- ESPECTRES CORRESPONENTS A LES VALORACIONS UV-vis DELS LLIGANDS ETF, TMA I TMET

- DADES DE RMN CORRESPONENTS A LA IODACIÓ DELS LLIGANDS PRECURSORS DEL COMPOST TMET

- ARTICLE 1. Design, Selection and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application I Alzheimer's Disease

  J. Am. Chem. Soc., **2009**, 131(4), 1346

- ARTICLE 2. Crystal structure of thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights and implications at the molecular level

  Article enviat per a la seva publicació

ESPECTRES CORRESPONENTS A LES VALORACIONS UV-vis DELS LLIGANDS ETF, TMA I TMET

DADES DE RMN CORRESPONENTS A LA REACCIÓ DE IODACIÓ DELS LLIGANDS PRECURSORS DEL COMPOST TMET

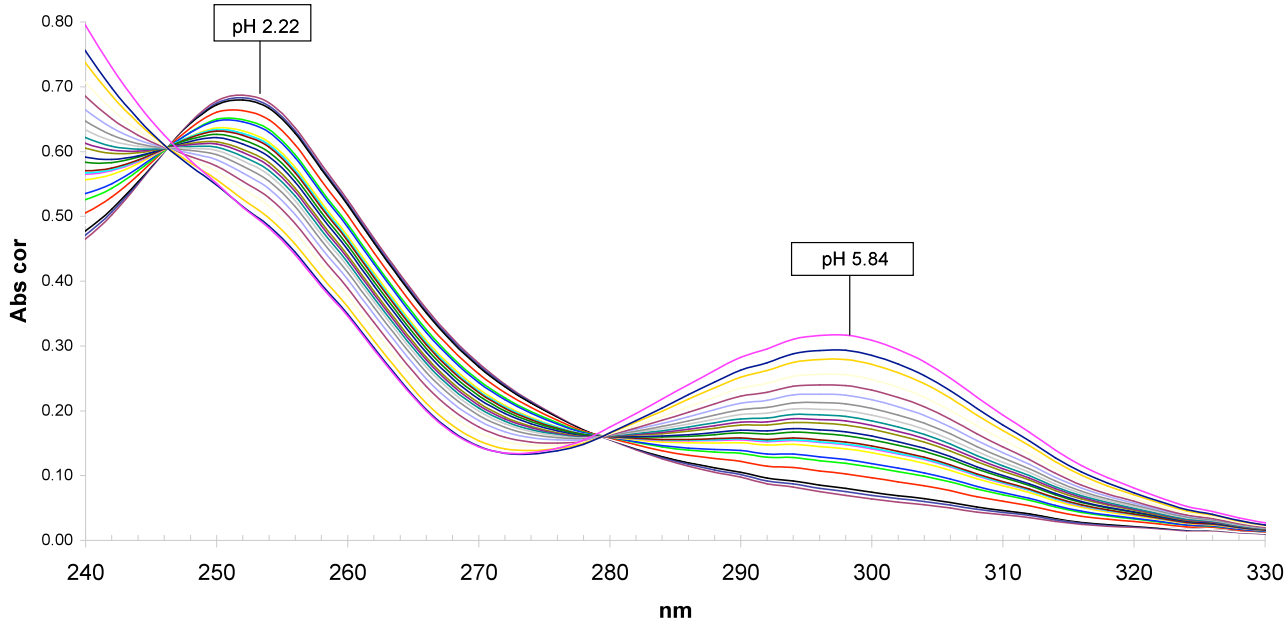


Figura A.1a. *VALORACIÓ 1 SISTEMA TMA-Cu(II).* Evolució espectral del sistema TMA-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMA] = $1.03x10^{-4}$ M [Cu(II)] = $1.92x10^{-4}$ M

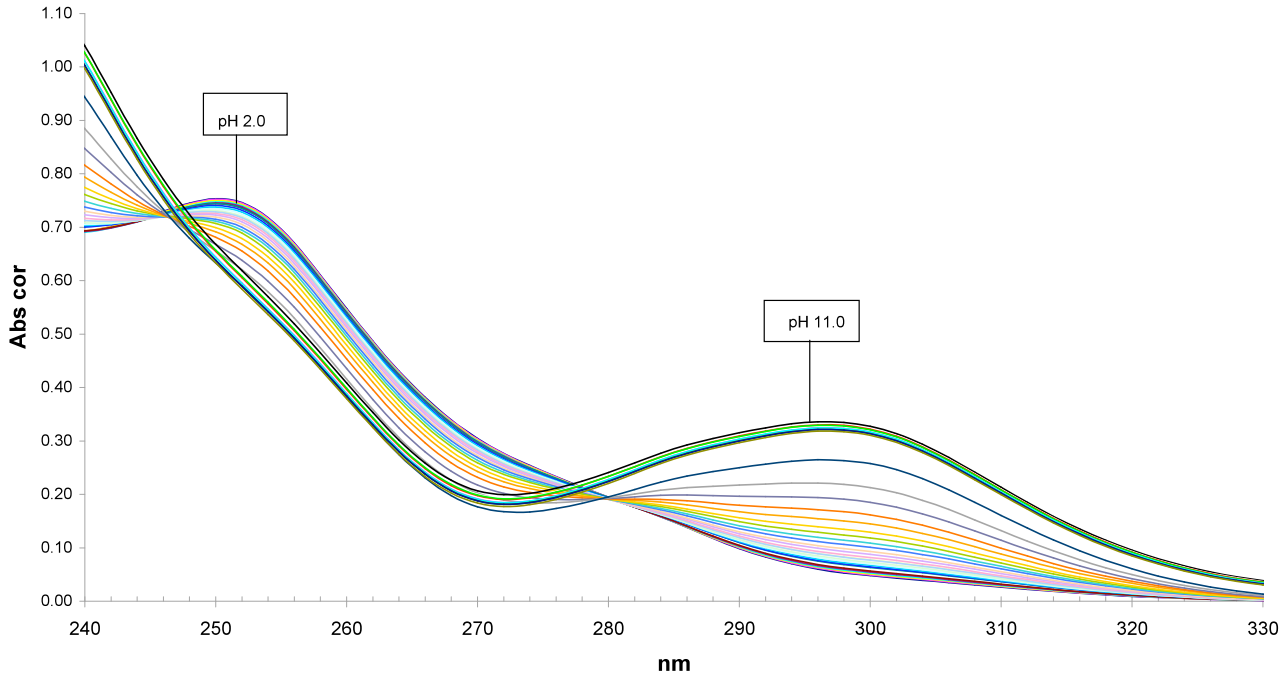


Figura A.1b *VALORACIÓ 2 SISTEMA TMA-Cu(II).* Evolució espectral del sistema TMA-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMA]=$1.03x10^{-4}$M [Cu(II)]=$4.80x10^{-5}$M

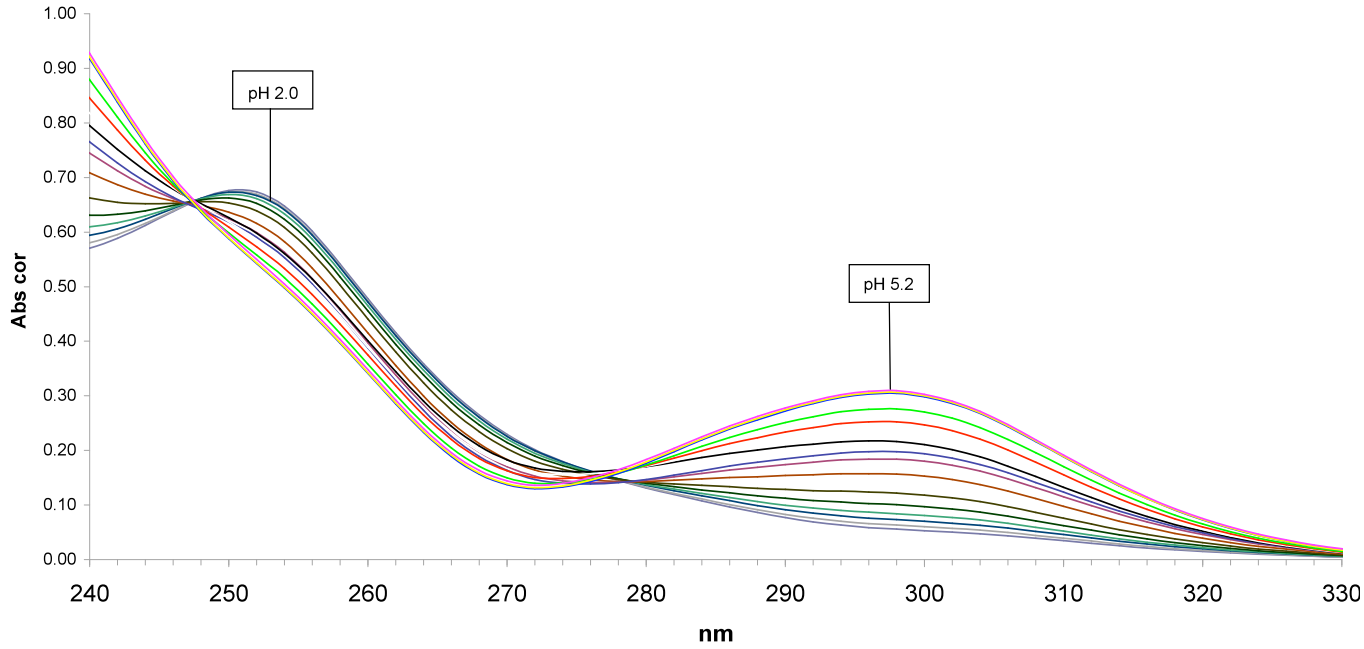


Figura A.2a *VALORACIÓ 1 SISTEMA TMA-Zn(II).* Evolució espectral del sistema TMA-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMA] = 1.03×10^{-4} M [Zn(II)] = 1.69×10^{-4}M

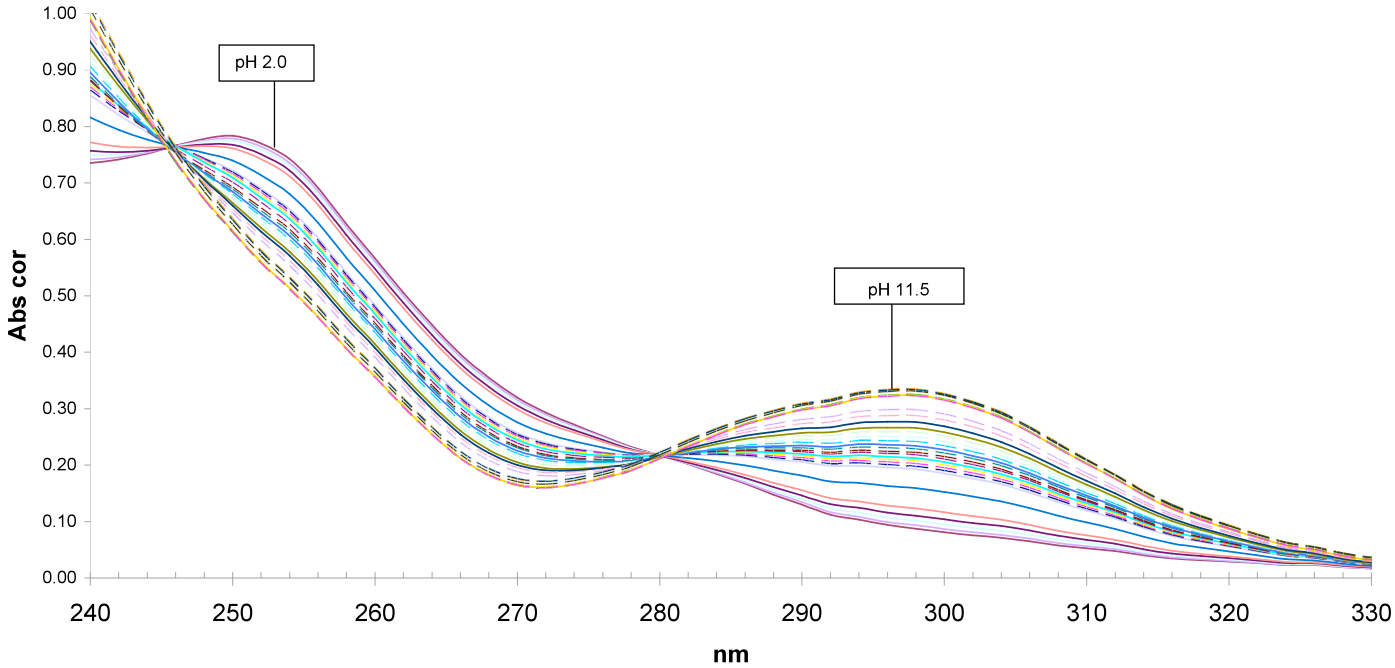


Figura A.2b *VALORACIÓ 2 SISTEMA TMA-Zn(II).* Evolució espectral del sistema TMA-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [[TMA] = 1.03×10^{-4} M [Zn(II)] = 4.22×10^{-5}M

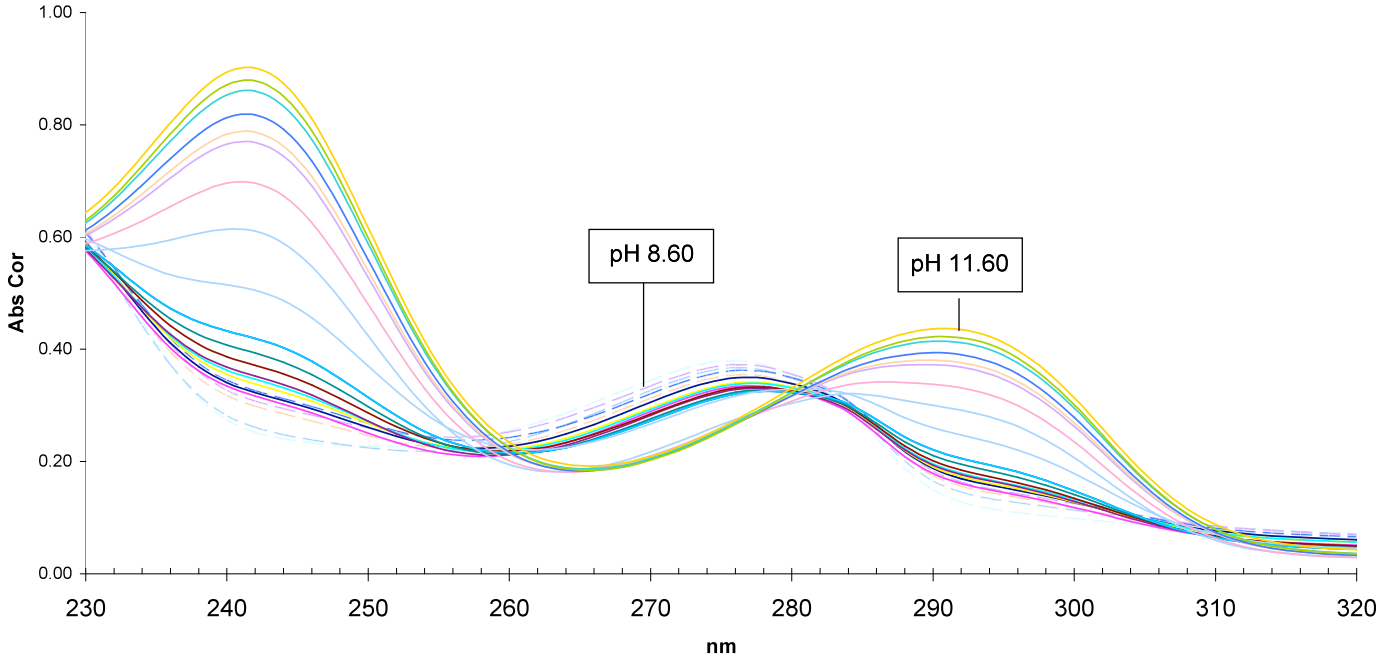


Figura A.3a *VALORACIÓ 1 SISTEMA ETF-Cu(II).* Evolució espectral del sistema ETF-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [ETF] = 1.07×10^{-4} M [Cu(II)] = 1.92×10^{-4}M

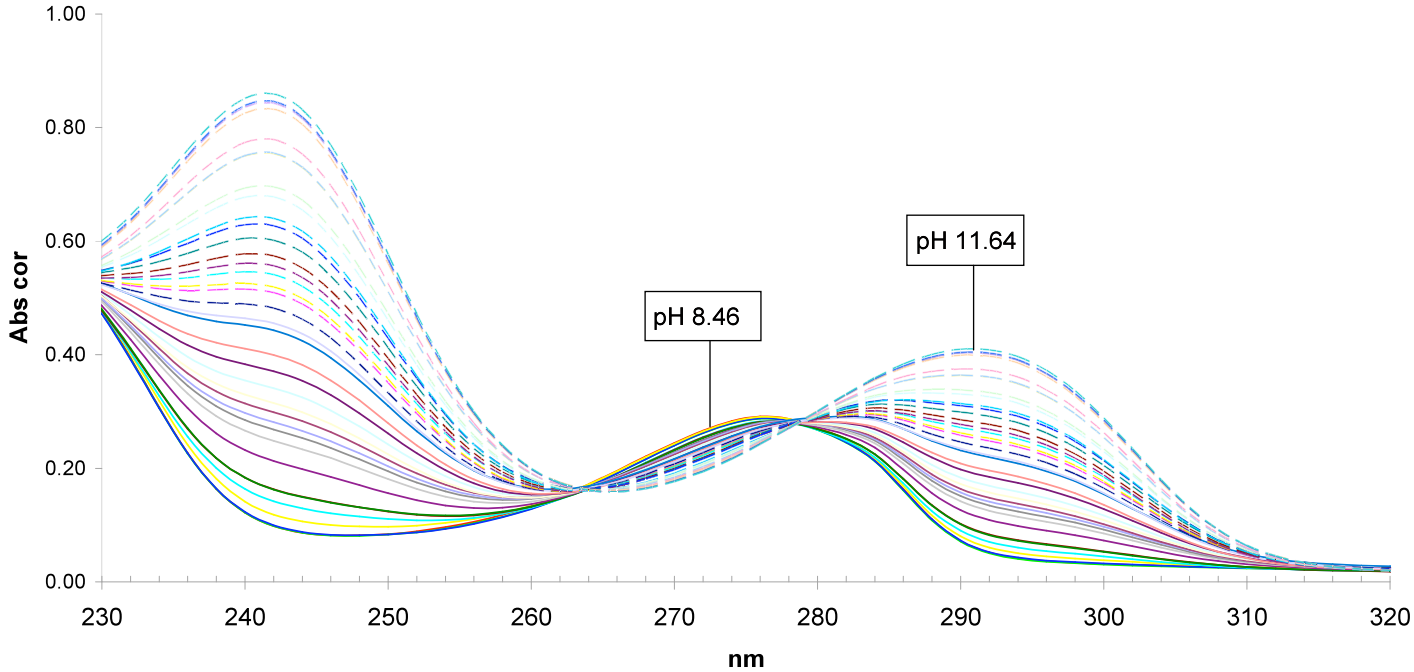


Figura A.3b *VALORACIÓ 2 SISTEMA ETF-Cu(II).* Evolució espectral del sistema ETF-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [ETF] = 1.07×10^{-4} M [Cu(II)] = 4.80×10^{-5}M

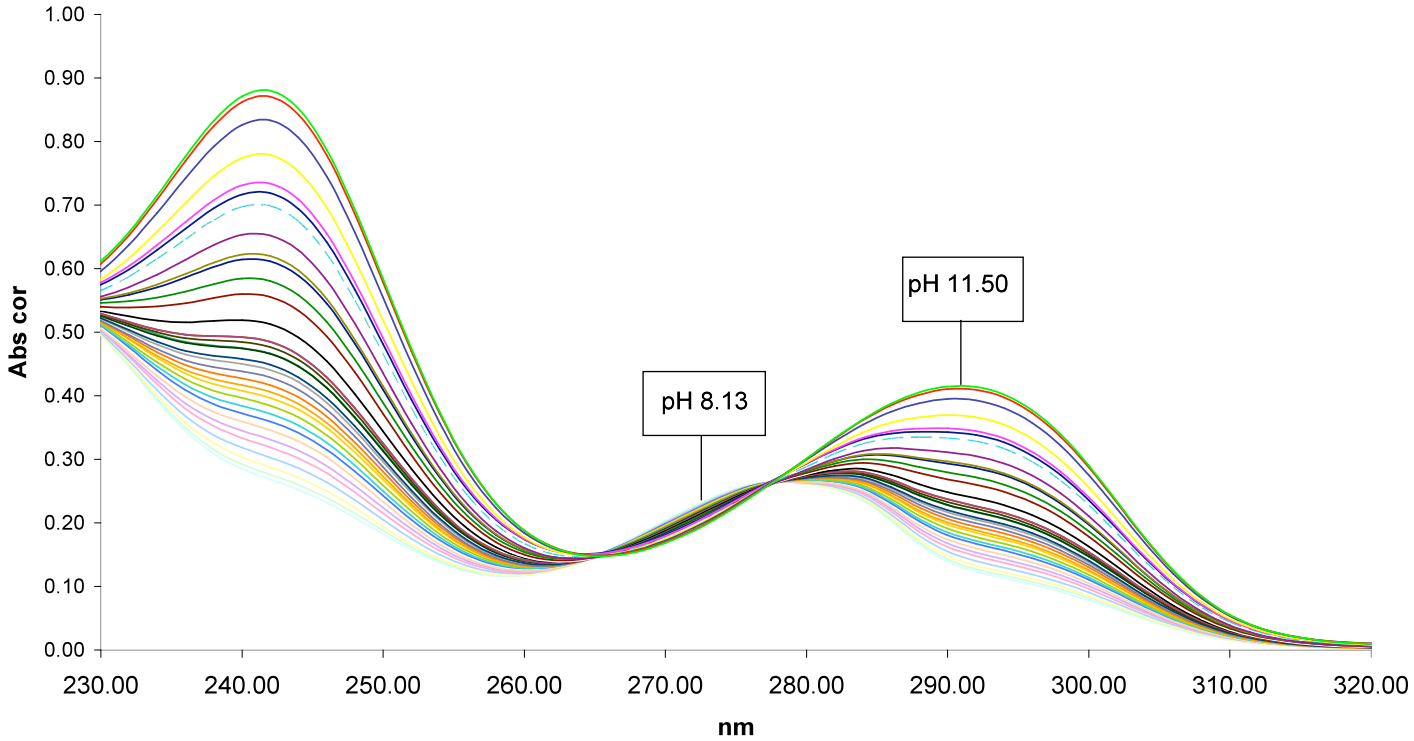


Figura A.4a *VALORACIÓ 1 SISTEMA ETF-Zn(II).* Evolució espectral del sistema ETF-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [ETF] = 1.07×10^{-4} M [Zn(II)] = 1.69×10^{-4}M

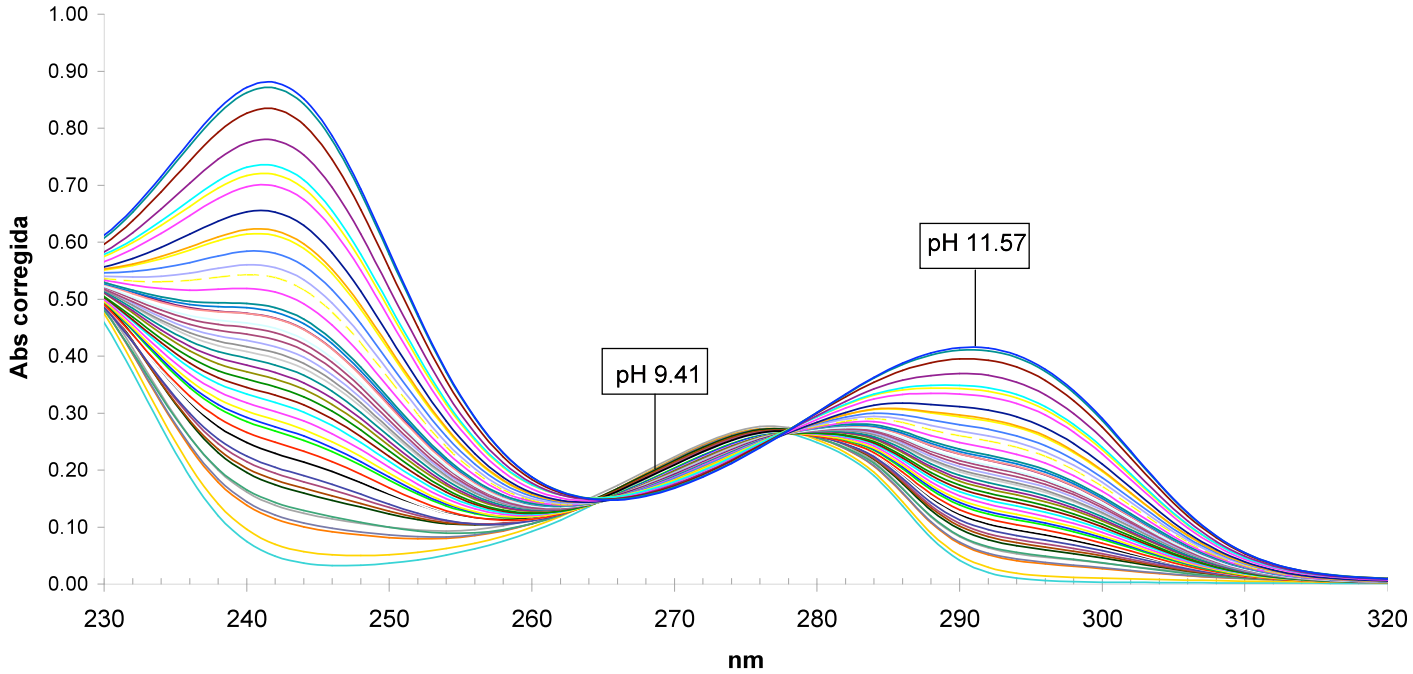


Figura A.4b *VALORACIÓ 2 SISTEMA ETF-Zn(II).* Evolució espectral del sistema ETF-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [ETF] = 1.07×10^{-4} M [Zn(II)] = 4.80×10^{-5}M

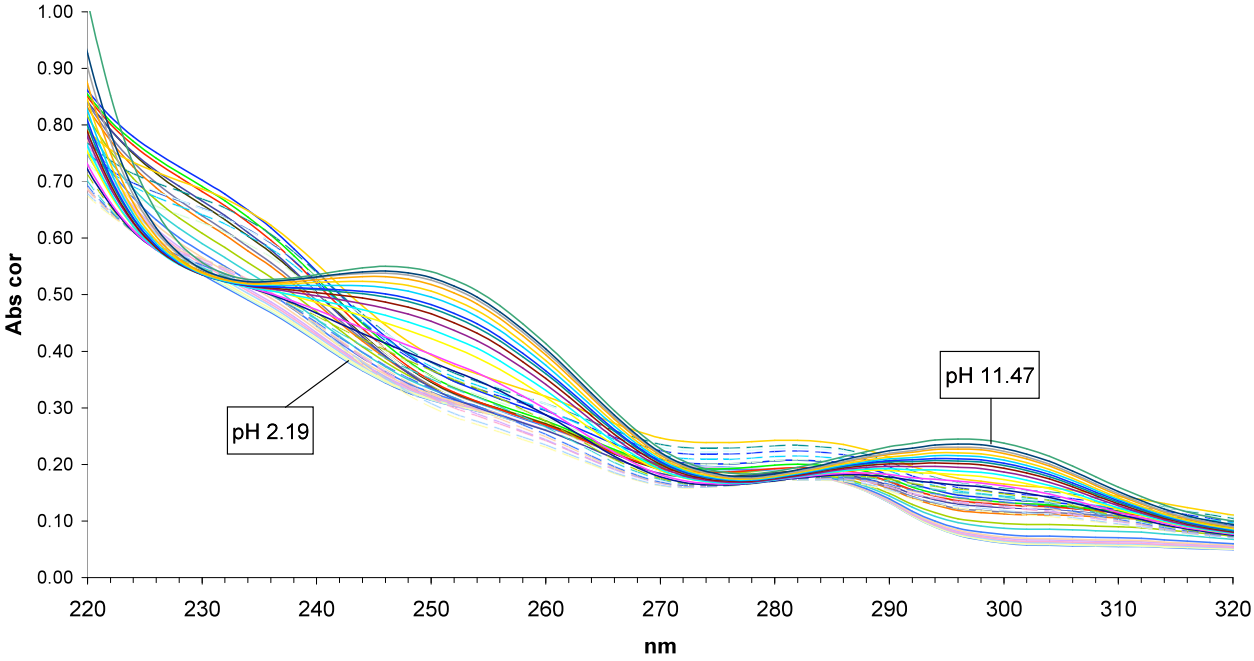


Figura A.5a *VALORACIÓ 1 SISTEMA TMET-Cu(II).* Evolució espectral del sistema TMET-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMET] = 4.15×10^{-5} M [Cu(II)] = 1.92×10^{-4}M

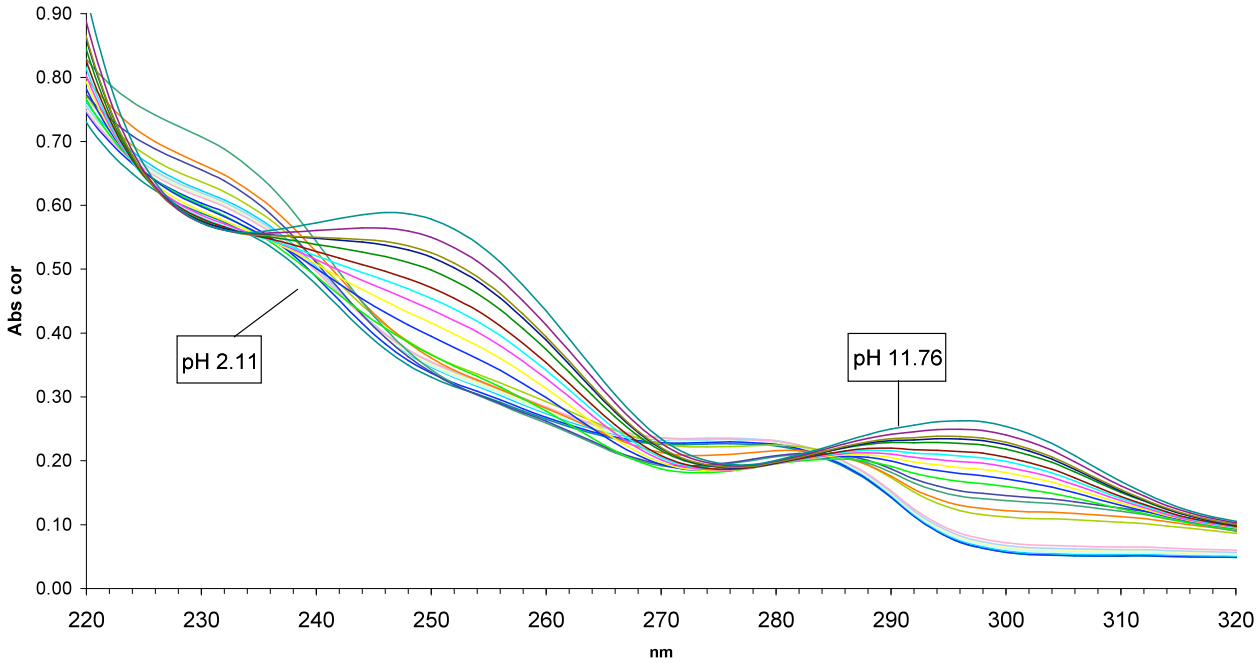


Figura A.5b *VALORACIÓ 2 SISTEMA TMET-Cu(II).* Evolució espectral del sistema TMET-Cu(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMET] = 4.15×10^{-5} M [Cu(II)] = 4.80×10^{-5}M

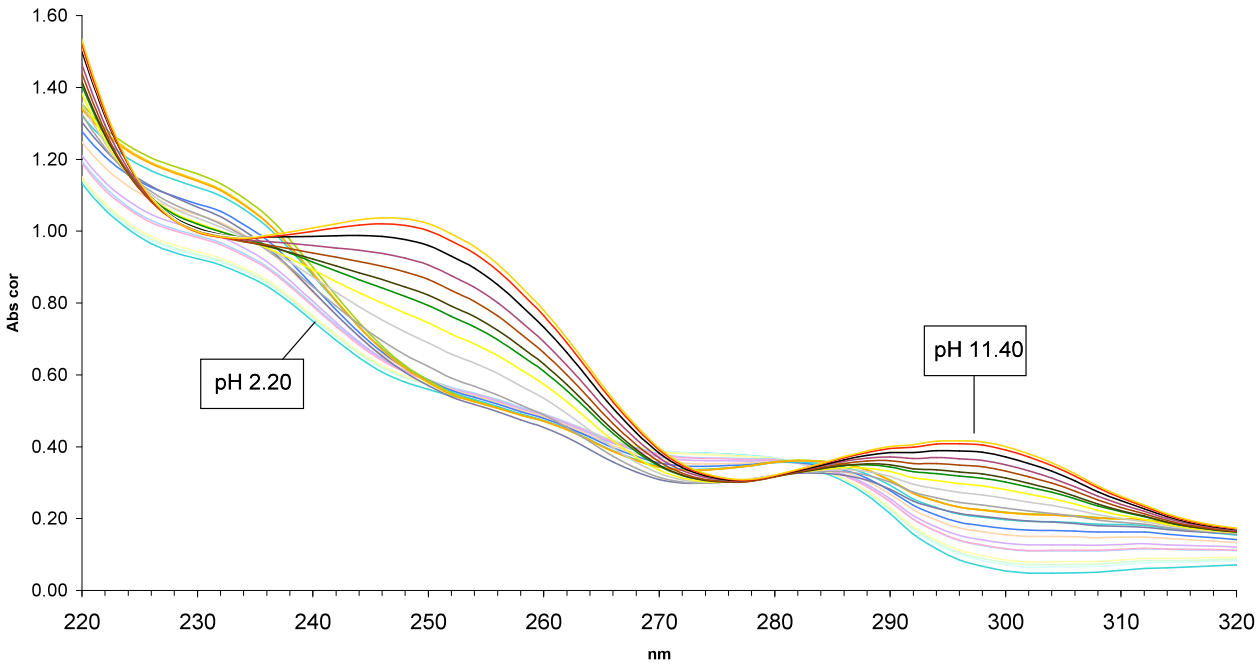


Figura A.6a *VALORACIÓ 1 SISTEMA TMET-Zn(II).* Evolució espectral del sistema TMET-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMET] = 8.32 x10^{-5}M [Zn(II)] = 1.69x10^{-4} M

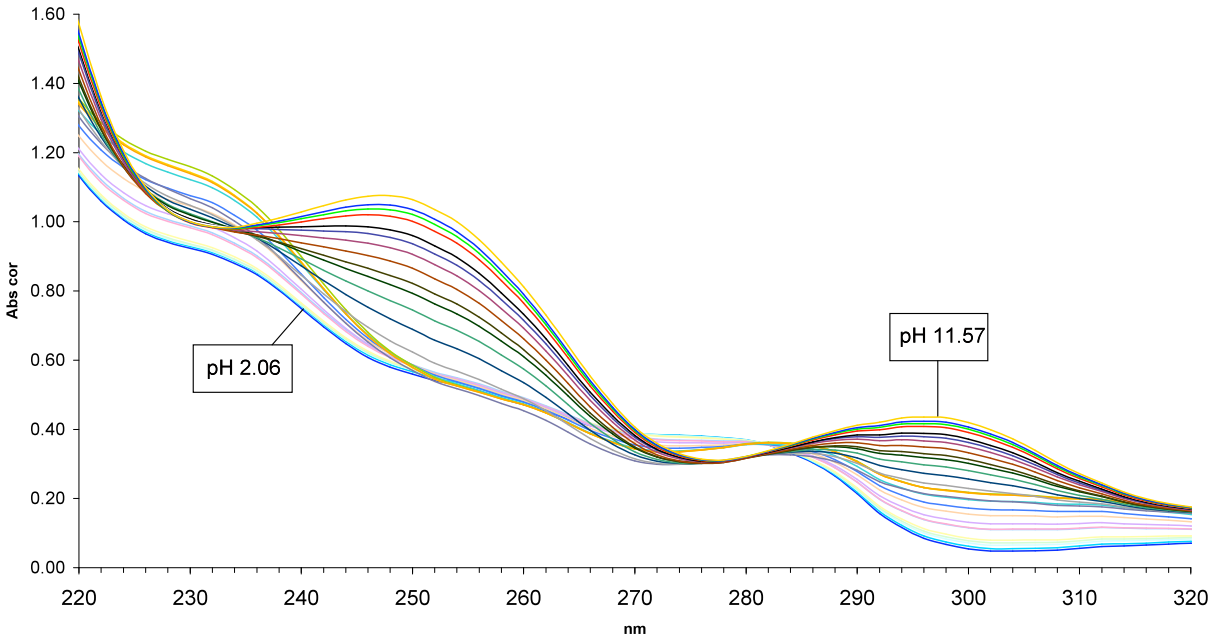
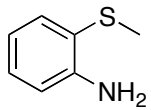
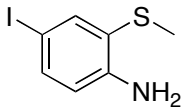
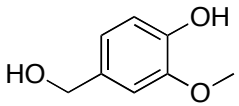
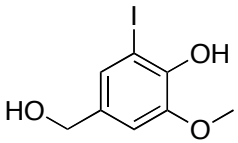
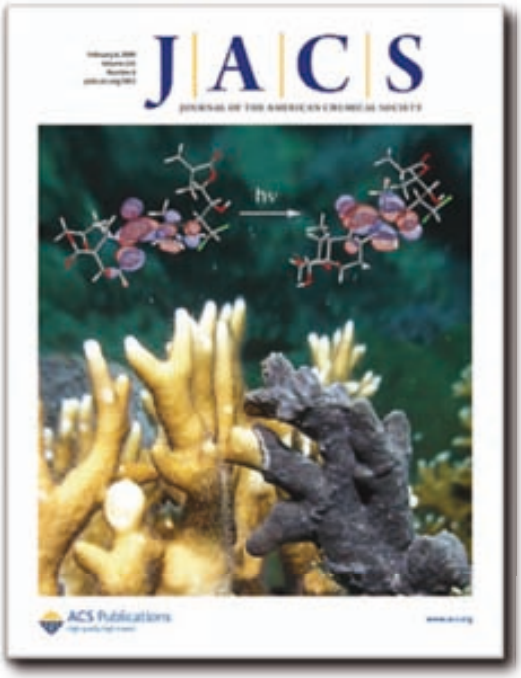


Figura A.6b *VALORACIÓ 2 SISTEMA TMET-Zn(II).* Evolució espectral del sistema TMET-Zn(II) al llarg de la valoració amb NaOH. Les concentracions inicials són: [TMET] = 8.32 x10^{-5}M [Zn(II)] = 4.22x10^{-5} M

PARÀMETRES DE RMN I DE HPLC DELS COMPOSTOS DE PARTIDA I DELS PRODUCTES IODATS AMB $[Ipy_2]BF_4$

MOLÈCULA	FM	PM (g/mol)	^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C-RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)	t_R (min) HPLC (H_2O:ACN)
	C_7H_9NS	139.22	2.37 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 6.71 (dd, J=7.5 Hz, J= 1.5 Hz, 1H), 6.76 (dd, J=7.5 Hz, J= 1.5 Hz, 1H), 7.10 (d, J=7.8 Hz,1H), 7.34 (d, J=7.5 Hz,1H)	17.5, 115.1, 118.3, 120.4, 129.8, 133.6, 147.3	5.6
	C_7H_8INS	139.22	2.37 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 6.50 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, J=8.4 Hz, J=2.1Hz,1H), 7.61 (d, J=2.1 Hz, 1H)	17.8, **78.8**, 116.84, 122.9, 137.4, 140.5, 146.7	21.4
	$C_8H_{10}O_3$	154.16	4.25 (s, 3H), 4.90 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 7.17 (d, J=0.37 Hz, 1H), 7.19 (dd, J=1.83 Hz, J=0.37 Hz, 1H), 7.34 (d, J=1.83 Hz, 1H)		7.72
	$C_8H_9IO_3$	280.06	3.89 (s, 3H), 4.58 (s, 2H), 4.60 (s, 2H), 6.88 (d, J = 1.81 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.81 Hz, 1H)		15.6



ARTICLE 1

Design, Selection and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer's Disease

J. Am. Chem. Soc., **2009**, 131(4), 1436

JACS
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Subscriber access provided by UNIV AUTONOMA DE BARCELONA

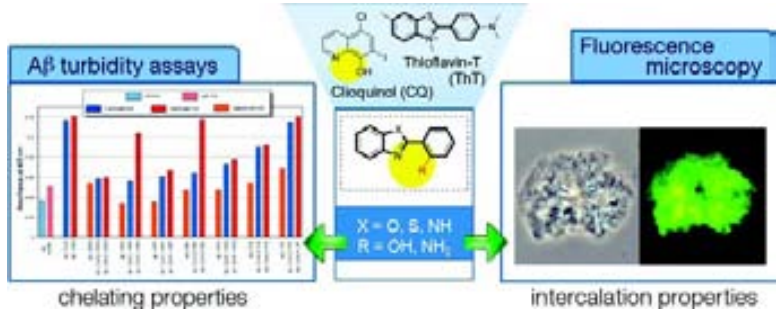
Article

Design, Selection, and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer's Disease

Cristina Rodri#guez-Rodri#guez, Natalia Sa#nchez de Groot, Albert Rimola, A#ngel A#lvarez-Larena, Vega Lloveras, Jose# Vidal-Gancedo, Salvador Ventura, Josep Vendrell, Mariona Sodupe, and Pilar Gonza#lez-Duarte

J. Am. Chem. Soc., **2009**, 131 (4), 1436-1451 • DOI: 10.1021/ja806062g • Publication Date (Web): 09 January 2009

Downloaded from http://pubs.acs.org on February 3, 2009



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

View the Full Text HTML

ACS Publications
High quality. High impact.

Journal of the American Chemical Society is published by the American Chemical Society. 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

J|A|C|S ARTICLES

Published on Web 01/09/2009

Design, Selection, and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer's Disease

Cristina Rodríguez-Rodríguez,[†] Natalia Sánchez de Groot,[‡] Albert Rimola,[†] Ángel Álvarez-Larena,[§] Vega Lloveras,[||] José Vidal-Gancedo,[||,⊥] Salvador Ventura,[‡] Josep Vendrell,[‡] Mariona Sodupe,[†] and Pilar González-Duarte*,[†]

Departament de Química, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, and Servei de Difracció de Raigs X, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, and Institut de Ciència de Materials de Barcelona (CSIC) and Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Campus Universitari de Bellaterra, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received August 1, 2008; E-mail: pilar.gonzalez.duarte@uab.cat

Abstract: Metal chelation is considered a rational therapeutic approach for interdicting Alzheimer's amyloid pathogenesis. At present, enhancing the targeting and efficacy of metal-ion chelating agents through ligand design is a main strategy in the development of the next generation of metal chelators. Inspired by the traditional dye Thioflavin-T, we have designed new multifunctional molecules that contain both amyloid binding and metal chelating properties. In silico techniques have enabled us to identify commercial compounds that enclose the designed molecular framework (**M1**), include potential antioxidant properties, facilitate the formation of iodine-labeled derivatives, and can be permeable through the blood–brain barrier. Iodination reactions of the selected compounds, 2-(2-hydroxyphenyl)benzoxazole (**HBX**), 2-(2-hydroxyphenyl)benzothiazole (**HBT**), and 2-(2-aminophenyl)-1*H*-benzimidazole (**BM**), have led to the corresponding iodinated derivatives **HBXI**, **HBTI**, and **BMI**, which have been characterized by X-ray diffraction. The chelating properties of the latter compounds toward Cu(II) and Zn(II) have been examined in the solid phase and in solution. The acidity constants of **HBXI**, **HBTI**, and **BMI** and the formation constants of the corresponding ML and ML_2 complexes [M = Cu(II), Zn(II)] have been determined by UV−vis pH titrations. The calculated values for the overall formation constants for the ML_2 complexes indicate the suitability of the **HBXI**, **HBTI**, and **BMI** ligands for sequestering Cu(II) and Zn(II) metal ions present in freshly prepared solutions of β-amyloid (Aβ) peptide. This was confirmed by Aβ aggregation studies showing that these compounds are able to arrest the metal-promoted increase in amyloid fibril buildup. The fluorescence features of **HBX**, **HBT**, **BM**, and the corresponding iodinated derivatives, together with fluorescence microscopy studies on two types of pregrown fibrils, have shown that **HBX** and **HBT** compounds could behave as potential markers for the presence of amyloid fibrils, whereas **HBXI** and **HBTI** may be especially suitable for radioisotopic detection of Aβ deposits. Taken together, the results reported in this work show the potential of new multifunctional thioflavin-based chelating agents as Alzheimer's disease therapeutics.

Introduction

The devastating effects of Alzheimer's disease (AD) on human beings and its predicted increase in incidence in the coming years due to the aging of society account for the current intensive studies aimed at preventing and treating AD.[1−4] β-Amyloid (Aβ) plaques, which are a key neuropathological feature of AD, are mainly constituted by aggregation of the Aβ peptide, a 39- to 43-residue degradation fragment of a much larger Aβ precursor protein (APP). The origin of these insoluble extracellular neurotoxic deposits is still not clear, and multiple factors such as pH, metal ions, protein concentration, and oxidative stress have been reported to trigger their formation. To date, the potential antiamyloid therapeutic approaches to AD focus on the amyloid cascade theory, the Aβ vaccine, or treatment with metal-complexing agents.[1,5,6]

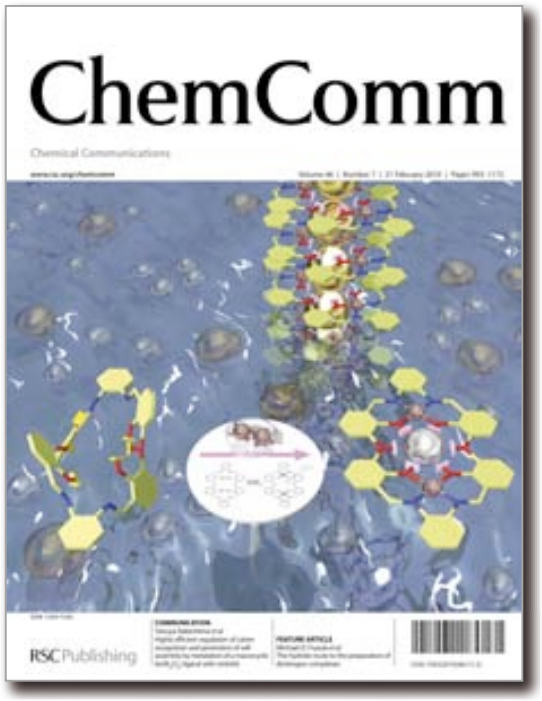
[†] Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona.
[‡] Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona.
[§] Servei de Difracció de Raigs X, Universitat Autònoma de Barcelona.
[||] Institut de Ciència de Materials de Barcelona (CSIC), Campus Universitari de Bellaterra.
[⊥] Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Campus Universitari de Bellaterra.

(1) Finefrock, A. E.; Bush, A. I.; Doraiswamy, P. M. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2003**, *51*, 1143–1148.
(2) Nordberg, A. *Lancet Neurol.* **2004**, *3*, 519–527.
(3) Brown, D. R.; Kozlowski, H. *Dalton Trans.* **2004**, 1907–1917.
(4) Storr, T.; Merkel, M.; Song-Zhao, G. X.; Scott, L. E.; Green, D. E.; Bowen, M. L.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Schugar, H. J.; Orvig, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7453–7463.
(5) Barnham, K. J.; Bush, A. I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 222–228.
(6) Barnham, K. J.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Melov, S.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Drug Des. Rev.—Online* **2004**, *1*, 75–82.

10.1021/ja806062g CCC: $40.75 © 2009 American Chemical Society

Per consultar tot el text d'aquest article visiteu:

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja806062g



ARTICLE 2

Crystal structure of thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights at the molecular level

Chem. Commun., ***2010***, *46, 1156–1158*

Crystal structure of thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights at the molecular level†

Cristina Rodríguez-Rodríguez,[a] Albert Rimola,[b] Luis Rodríguez-Santiago,[a] Piero Ugliengo,[b] Ángel Álvarez-Larena,[c] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[d] Mariona Sodupe*[a] and Pilar González-Duarte*[a]

Received (in Cambridge, UK) 26th June 2009, Accepted 2nd December 2009
First published as an Advance Article on the web 4th January 2010
DOI: 10.1039/b912396b

Combining X-ray data on thioflavin-T and theoretical calculations on its binding to a peptide model for $A\beta_{1-42}$ fibrils gives evidence of main stabilizing interactions, which influence the dihedral angle between the two moieties of thioflavin-T and thereby its fluorescence properties; these results shed new light on possible strategies for the design of dyes to bind amyloid fibrils more specifically.

The presence of amyloid fibrils is a key neuropathological feature in more than 20 diseases, including Alzheimer's disease (AD).[1] Most of these protein aggregates have a generic structure that consists of a continuous β-sheet.[2] The fluorescent dye thioflavin-T (ThT) has been commonly used to stain amyloid deposits in tissues[3] and to characterise the presence of amyloid fibrils.[4] Chemically, ThT is the chloride salt of a cation (ThT^+) that consists of an *N*-methylated benzothiazole fragment linked to a dimethylaniline ring (Fig. 1). The dihedral angle between these two planar moieties, ϕ, largely determines the spectral properties of this dye, as shown by Stsiapura *et al.*[5] from a computational study of the torsional relaxation of ThT^+ in the excited state. However, the mechanism of fluorescence enhancement upon ThT^+ binding to amyloid fibrils and the molecular understanding of this binding are still objects of intensive study.[6] Both issues are critical in order to design new dyes to bind amyloid fibrils more specifically,[7,8] and for the development of diagnostic and therapeutic agents.

Recently, we have shown that incorporation of chelating properties into well-known intercalation compounds such as ThT^+ may be a successful strategy for developing the next generation of agents for AD theragnosis.[9] Remarkably, there are no X-ray structural data on the free ThT^+ but only when bound to the *Torpedo californica* acetylcholinesterase (*Tc*AChE) protein,[10] one of the few examples showing that ThT^+ also binds to non-β-sheet cavities. Overall, in order to shed light onto ThT^+-binding interactions, we have undertaken an experimental and theoretical study of the structure of unbound ThT^+. Subsequently, we have examined its binding to the fibrillar core structure of $A\beta_{1-42}$ peptide[11] by combining docking and molecular dynamics (MD) strategies with quantum chemical calculations.

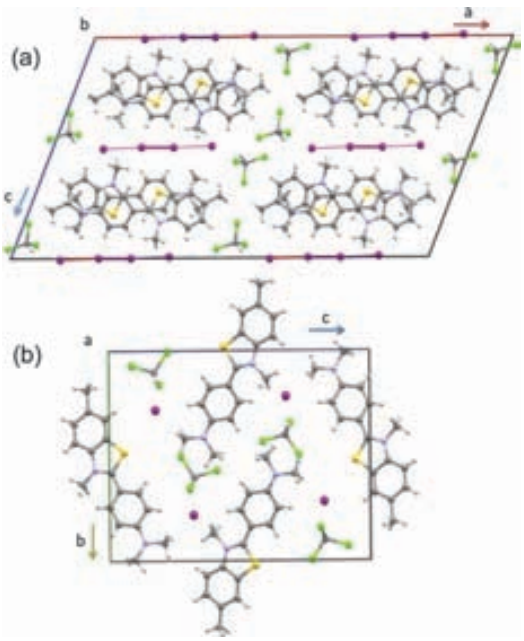


Fig. 1 Unit cells of **1** (a) and **2** (b): I_4^{2-} and I^- anions in purple; chlorine, nitrogen and sulfur atoms in green, blue and yellow, respectively.

Treatment of (ThT)Cl with NaI, as detailed in the experimental section (see ESI†), yielded X-ray quality crystals of $(ThT)_2I_4{\cdot}2CHCl_3$ (**1**) and $(ThT)I{\cdot}CHCl_3$ (**2**).[12] The unit cells are shown in Fig. 1. Both I_4^{2-} (**1**) and I^- (**2**) anions establish weak C–H···I interactions with the $CHCl_3$ solvent molecules. I_4^{2-}, whose formation is probably due to aerobic oxidation, shows a centrosymmetric essentially linear geometry, consistent with reported data.[13,14] This anion appears to be essential for the effective packing arrangement of the ThT^+ cations in **1**, which is formed in much shorter time than **2**. Our unsuccessful attempts to obtain any crystal structure under other experimental conditions evidence the relevance of the iodide anions and $CHCl_3$ solvent in the formation of X-ray quality crystals. Remarkably, the closest related analogs of ThT^+ with known crystal structures are not cationic species but neutral molecules.[15–17]

[a] *Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: mariona.sodupe@uab.cat, pilar.gonzalez.duarte@uab.cat*
[b] *Dipartimento di Chimica IFM and NIS Centre of Excellence, Università degli Studi di Torino, 10125 Torino, Italy*
[c] *Servei de Difracció de Raigs X, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*
[d] *Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, CHUS, 15786 Santiago de Compostela, Spain*

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental, X-ray diffraction and computational details. CCDC 728298 and 728299. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/b912396b

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

Per consultar tot el text d'aquest article visiteu:

http://www.rsc.org/publishing/journals/CC/article.asp?doi=b912396b

Universitat Autònoma de Barcelona