

# Caracterización energética de la unión de 1,3,6-naftalén trisulfonato al factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano: implicaciones para su uso como agente anti-angiogénico

*Energetic characterization of 1,3,6-naphthalene trisulfonate binding to human acidic fibroblast growth factor: implications for its anti-angiogenic use*

GARCÍA-MIRA M, GUZMÁN-CASADO M, GIMÉNEZ-GALLEGO G\*, PARODY-MORREALE A

Departamento de Química-Física e Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, España y \*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España. Email: aparody@ugr.es  
Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto BIO2000-1437 (MCYT).

## RESUMEN

Se ha estudiado, mediante calorimetría isotérmica de reacción, la interacción del agente anticancerígeno 1,3,6-naftalén trisulfonato con el factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano. La afinidad decrece con el aumento de la fuerza iónica. A pH 7,0 y NaCl 0,15 M, la constante de unión de la proteína con el ligando se encuentra en el rango  $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$ , una afinidad dos órdenes de magnitud menor que la del FGfA por heparina. El cambio de entalpía favorece la interacción, siendo el cambio de entropía desfavorable. De la dependencia del cambio de entalpía con la temperatura se calculó un pequeño cambio en la capacidad calorífica del proceso, con un valor excepcionalmente positivo de  $90 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ . A partir de los datos termodinámicos medidos y de ecuaciones paramétricas establecidas en la literatura, se calcularon cambios en la superficie accesible al disolvente, tanto polar como apolar, que acompañan a la interacción. Los resultados se compararon con los medidos mediante resonancia magnética nuclear. El estudio incluye consideraciones de bioenergética estructural sobre el posible uso de 1,3,6-naftalén trisulfonato como agente antiangiogénico o como molécula líder para el desarrollo de fármacos anti-angiogénicos.

PALABRAS CLAVE: 1,3,6-naftalén trisulfonato. Factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano. Calorimetría isotérmica de reacción. Antiangiogénesis. Bioenergética. Diseño de fármacos.

## ABSTRACT

*The equilibrium interaction of anti-cancer agent 1,3,6-naphthalene trisulfonate with human acidic fibroblast growth factor has been studied by calorimetry. The affinity decreases with increasing ionic strength. At pH 7.0 and 0.15 M NaCl concentration, a binding constant of the protein with the ligand was estimated in the  $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$  range, an affinity two orders of magnitude lower than that of aFGF with heparin. The interaction is enthalpically driven, and the entropy change is unfavorable. A small heat capacity change with an unusual positive value of  $90 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$  was determined from the temperature dependence of the enthalpies. Changes in accessible apolar and polar surface areas in the interaction were calculated from the thermodynamic data obtained and parametric equations in the literature. The results were compared with those measured from NMR data. The study includes structural bioenergetic considerations about the possible use of 1,3,6-naphthalene trisulfonate as an anti-angiogenic agent itself, or as a lead for the development of anti-angiogenic drugs.*

KEY WORDS: 1,3,6-naphthalene trisulfonate. Human acidic fibroblast growth factor. Isothermal titration calorimetry. Anti-angiogenesis. Energetically driven drug design.

Recepción: 07-VI-2006

Aceptación: 29-IX-2006

## INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento para fibroblastos (FGFs) constituyen un grupo de proteínas de 23 miembros<sup>1</sup> que se encuentran en diferentes organismos, desde nematodos hasta humanos), y que poseen un amplio rango de actividades biológicas. El factor de crecimiento ácido (FGFa o FGF-1) es la primera proteína de la familia y junto a la forma básica (FGFb o FGF-2) son los miembros mejor caracterizados de la misma.

Los FGFs son proteínas angiogénicas potentes que requieren, para el desarrollo de su actividad mitogénica, de heparina o de análogos de la heparina. Por otra parte, desde hace tiempo, se considera a la antiangiogénesis como una forma plausible de lucha contra el cáncer<sup>3</sup>. El 1,3,6-naftalén trisulfonato (NTS) es una función química común de las suraminas y suradistas, que constituyen un importante grupo de agentes contra el cáncer. Se ha demostrado que el NTS inhibe la actividad angiogénica del FGFa, tanto *in vitro*<sup>4</sup> como *in vivo*<sup>5,6</sup>. Mediante RMN se ha estudiado la estructura tridimensional de una forma de FGFa de 132 aminoácidos unida a NTS<sup>4</sup>. Mediante este estudio se ha demostrado que el NTS puede competir tanto con la heparina como con el *myo*-inositol hexasulfato por el sitio de unión a heparina en la proteína. El *myo*-inositol hexasulfato es un análogo de la heparina que también induce la proliferación de fibroblastos; la estructura del FGFa con este ligando unido también se ha estudiado mediante RMN<sup>7</sup>. La comparación de las estructuras muestra que, con NTS unido, el FGFa es más flexible y que la región del mismo que interacciona con sus receptores transmembrana con actividad tirosina kinasa son diferentes.

Presentamos aquí un estudio calorimétrico de la unión de NTS a FGFa. Con ello avanzamos en la caracterización de la interacción a través del conocimiento de parámetros energéticos. La molécula de FGFa utilizada ha sido la misma (truncada en el extremo amino terminal) que la utilizada en los experimentos de RMN. El NTS es un candidato para el desarrollo de inhibidores

*Abreviaturas:* FGFa: factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano; FGFs: familia de los factores de crecimiento para fibroblastos; NaPi: ortofosfato de sodio; RMN: resonancia magnética nuclear; NTS: 1,3,6-naftalén trisulfonato.

## INTRODUCTION

Fibroblast growth factor (FGFs) is a protein group of 23 members<sup>1</sup> found in organisms ranging from nematodes to humans<sup>2</sup> that has a broad range of biological activities. Acidic fibroblast growth factor (aFGF or FGF-1) is the first protein of the family, and both it and basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF-2) are the best characterized members.

FGFs are powerful angiogenic proteins whose mitogenic activity requires heparin or heparin-like compounds. Anti-angiogenesis has long been considered as a plausible way to fight cancer<sup>3</sup>. 1,3,6-naphthalene trisulfonate (NTS) is a common chemical function of suramin and suradistas, which are important groups of anti-cancer agents. NTS has been demonstrated to inhibit the angiogenic activity of aFGF both *in vitro*<sup>4</sup> and *in vivo*<sup>5,6</sup>. The three-dimensional NMR structure of a 132 amino acid form of aFGF bound to NTS has been reported<sup>4</sup>. This latter study showed that NTS can compete with either heparin or *myo*-inositol hexasulfate for the heparin binding site in the protein. *Myo*-inositol hexasulfate is a heparin analog that also induces fibroblast proliferation; the aFGF NMR structure with this bound ligand has also been studied<sup>7</sup>. Comparison of both NMR structures shows that NTS-bound aFGF structure is more flexible and that the conformation of the regions that interact with the transmembrane tyrosine kinases are different in both structures,

We present here a calorimetric study of NTS binding to aFGF. This enables further characterization of the interaction through knowledge of the energetic parameters. The aFGF molecule used in the study was the same (truncated in the amino terminal end) as was used in the NMR experiments. NTS is a candidate for the development of angiogenesis inhibitors to fight cancer and other blood vessel-dependent diseases. Energetic characterization lays the ground for the application of thermodynamic methods to drug design<sup>8</sup>. We conclude that NTS could be used as a lead for the development of anti-angiogenic

*Abbreviations:* aFGF: human acidic fibroblast growth factor; FGFs: fibroblast growth factor family; NaPi: sodium orthophosphate; NMR: nuclear magnetic resonance; NTS: 1,3,6-naphthalene trisulfonate.

de la angiogénesis en la lucha contra el cáncer y otras enfermedades dependientes del desarrollo de vasos sanguíneos. La caracterización energética sienta las bases para la aplicación de métodos termodinámicos al diseño de fármacos<sup>8</sup>. Concluimos que el NTS podría ser utilizado como líder para el desarrollo de fármacos antiangiogénicos, tras una optimización entrópicamente dirigida a través de un aumento de su hidrofobicidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El 1,3,6-naftalén trisulfonato (NTS) se compró a Fluka. Los restantes reactivos usados en este trabajo se compraron bien a Sigma o a Merck.

Para la expresión del factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano (FGFa) se utilizó un vector pADF1 modificado<sup>9</sup>. El crecimiento de las células<sup>10</sup> y la purificación de la proteína<sup>11</sup> se han descrito previamente. El FGFa se obtenía, finalmente, como el eluato de una columna de Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia) en NaCl 1,5 M, NaP<sub>i</sub> 10 mM, pH 7,2, que se concentraba hasta una concentración de 8-10 mg ml<sup>-1</sup> y se guardaba en la cámara fría (4°C). Durante el período de realización de los experimentos, se registraron regularmente espectros de emisión de fluorescencia (con excitación a 280 nm) y siempre se obtuvo el espectro característico del FGFa nativo, con un máximo a 305 nm a pH neutro<sup>12</sup>. El cambio de tampón para preparar la muestra para los experimentos calorimétricos se realizó mediante una columna HR 10/10 "Fast Desalting" (Pharmacia), equilibrada en el tampón adecuado. La concentración de proteína se midió utilizando una absorbancia específica de 1,2 mg<sup>-1</sup>ml cm<sup>-1</sup> a 280 nm<sup>10</sup>. Para calcular las concentraciones molares se utilizó una masa molar de 14.916 Da<sup>7</sup>.

Los aminoácidos de la proteína se numeran de acuerdo con la posición que ocupan en la estructura primaria de la forma de 154 aminoácidos<sup>11</sup>.

Las titulaciones calorimétricas se realizaron con un calorímetro MCS (Microcal, MA, USA)<sup>13</sup>. En el procedimiento operativo habitual, la muestra se colocaba en una célula de reacción de, aproximadamente, 1,5 ml de volumen, en la que se realizaban inyecciones sucesivas de 10 µl desde una jeringa. Las concentraciones de FGFa en la célula de reacción y de NTS en la jeringa fueron, aproximadamente, 0,1 mM y 10 mM,

drugs after entropy-driven optimization by an increase in its hydrophobicity.

## MATERIALS AND METHODS

1,3,6-naphthalene trisulfonate (NTS) was bought from Fluka. The remaining reagents used in this work were bought either from Sigma or Merck.

For human acidic fibroblast growth factor (aFGF) expression, a modified<sup>9</sup> pADF1 vector was used. Cell growth<sup>10</sup> and protein purification<sup>11</sup> were previously described. aFGF was finally obtained as a Heparin-Sepharose CL-6B column eluate in 1.5 M NaCl, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7.2, which was concentrated to 8-10 mg ml<sup>-1</sup> and stored in the cold room (4°C). During the experimental period, emission fluorescence spectra (with excitation at 280 nm) were regularly recorded and the characteristic spectrum of native aFGF, with a 305 nm maximum<sup>12</sup> at neutral pH, was always obtained. Buffer exchange to prepare samples for calorimetry was done using a HR 10/10 fast desalting column (Pharmacia) equilibrated in the buffer in which the calorimetric experiment was to be performed. Protein concentration was measured using a specific absorbance of 1.2 mg<sup>-1</sup>ml cm<sup>-1</sup> at 280 nm<sup>10</sup>. A molecular mass of 14916 Da was used in the calculation of molar concentrations<sup>7</sup>.

Amino acid residues in the protein are numbered according to their position in the primary structure of the 154 amino acid form<sup>11</sup>.

Calorimetric titrations were made using a MCS titration calorimeter (Microcal, MA, USA)<sup>13</sup>. In the usual operating way, the sample was placed in a reaction cell of approximately 1.5 ml volume and successive 10 µl injections were made by syringe. aFGF concentrations in the reaction cell were approximately 0.1 mM and the NTS concentration in the syringe was around 10 mM. A blank experiment, in which NTS solution was injected in buffer alone, was run for every titration. Very low values, close to zero, were obtained in all cases.

For a 1:1 binding stoichiometry, analysis of the titration curve would yield the equilibrium constant and the enthalpy change for the interaction under study. The software of the instrument (Origin) was used in the analysis.

respectivamente. Para cada titulación se realizó un experimento en blanco, en el que se inyectaba NTS en tampón. Siempre se obtuvieron valores próximos a cero.

Para una estequiometría de unión 1:1, el análisis de la curva de titulación nos da la constante de equilibrio y el cambio de entalpía de la interacción. Este análisis se llevó a cabo con el propio programa (Origin) del instrumento.

Los cálculos de superficie accesible al disolvente (ASA) se realizaron con un programa desarrollado en nuestro laboratorio, basado en una modificación del algoritmo de Shrake-Rupley<sup>14</sup>, en el que se distribuyen uniforme y aleatoriamente 2.000 puntos sobre la superficie de la esfera de van der Waals solvatada correspondiente a los diferentes átomos de la proteína, distintos del hidrógeno. Se utilizó un radio de 1,4 Å para la sonda del disolvente y el conjunto de valores de Chothia para los átomos de la proteína.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La parte superior de la Figura 1 muestra el registro directo de una titulación calorimétrica típica de FGfA con NTS. La parte inferior muestra los valores corregidos (cuadrados) tras la integración de los picos, la substracción del experimento en blanco (que no se muestra) y la normalización para la concentración de ligando. Analizamos los datos suponiendo una estequiometría 1:1 en la interacción, tal y como se demuestra en los estudios estructurales mediante RMN<sup>4</sup>. La línea es el mejor ajuste del modelo a los datos, y los valores obtenidos para la constante de equilibrio y el cambio de entalpía de la reacción se recogen en la Tabla 1.

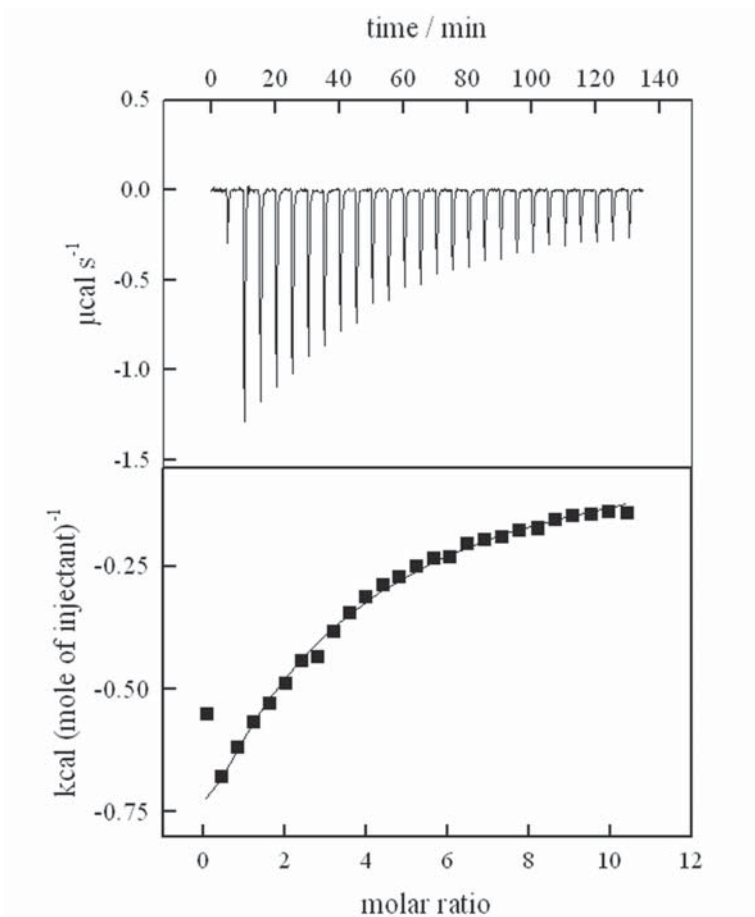
Accessible surface area (ASA) calculations were done using a program written by us and based on a modification of the Shrake-Rupley algorithm<sup>14</sup>, in which 2000 points are uniformly and randomly distributed on the surface of the solvated van der Waals sphere corresponding to each non-hydrogen protein atom. A radius of 1.4 Å for the solvent probe and the Chothia set for the protein atoms were always used.

## RESULTS AND DISCUSSION

The upper panel of Figure 1 shows the raw data for a representative calorimetric titration of aFGF with NTS. The lower panel shows the corrected values (as squares) after peak integration, subtraction of the blank experiment (not shown) and normalization for the ligand concentration. We analyzed the data assuming a 1:1 stoichiometry in the interaction, as demonstrated by structural NMR studies<sup>4</sup>. The line is the best fit of the model to the data, and the values obtained for the equilibrium constant and enthalpy change in the reaction are compiled in Table 1.

**FIGURA 1.** La parte superior muestra los datos obtenidos directamente en el experimento de titulación a 25 °C de FGFa 0,13 mM con NTS 6,7 mM en NaPi 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0. Se programó un bajo volumen en la primera inyección para minimizar problemas de dilución. Los calores corregidos y normalizados se muestran en la parte inferior, junto a la línea del mejor ajuste. Los parámetros determinados a partir de éste fueron:  $K = 1.000 \pm 30 \text{ M}^{-1}$  y  $\Delta H = -6,0 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

**FIGURE 1.** The upper panel depicts raw data for the titration of 0.13 mM aFGF with 6.7 mM NTS in 20 mM NaPi, 0.15 M NaCl, pH 7.0 at 25°C. A low volume first injection was programmed to minimize dilution problems. The corrected heats calculated are shown in the lower panel together with the best fit line. Binding parameters determined with this fit were  $K = 1000 \pm 30 \text{ M}^{-1}$ ,  $\Delta H = -6.0 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .



**Tabla 1.** Constantes de unión y cambios de entalpía para la interacción en NaPi 20 mM, pH 7,0, del 1,3,6 naftalén-trisulfonato con factor de crecimiento para fibroblastos ácido humano a diferentes fuerzas iónicas y temperatura.

**Table 1.** Binding equilibrium constants and enthalpy changes for the interaction of 1,3,6 naphthalene-trisulfonate with human acidic fibroblast growth factor at different ionic strengths and temperatures in 20 mM NaPi, pH 7.0.

[NaCl] / M						
0.15 M		0.25 M		0.40 M		
$\theta$ / °C	K / M <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kcal mol <sup>-1</sup>	K / M <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kcal mol <sup>-1</sup>	K / M <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kcal mol <sup>-1</sup>
15	830±30	-6.6±0.2	650±50	-5.2±0.3	420±40	-6.4±0.5
25	1000±30	-6.0±0.1	620±20	-5.9±0.1	nd	nd
35	780±60	-4.8±0.3	600±40	-4.8±0.2	nd	nd

n.d.: sin determinar

De izquierda a derecha y de arriba abajo, las concentraciones (mM) iniciales de proteína en la célula de reacción del calorímetro, en los diferentes experimentos, fueron: 0,09, 0,09, 0,09, 0,13, 0,09 y 0,12. Las correspondientes concentraciones (mM) del 1,3,6-naftaleno trisulfonato en la jeringa fueron: 9,0, 8,8, 8,7, 6,7, 11,1, 8,9 y 12,6.

nd: not determined

From left to right and top to bottom, starting protein concentrations (mM) in the reaction cell of the calorimeter in the different experiments were: 0.09, 0.09, 0.09, 0.13, 0.09, and 0.12. The corresponding 1,3,6-naphthalene-trisulfonate concentrations (mM) in the syringe were: 9.0, 8.8, 8.7, 6.7, 11.1, 8.9, and 12.6.

Realizamos varias titulaciones a diferentes concentraciones de NaCl y diferentes temperaturas, para determinar la constante de equilibrio y el cambio de entalpía bajo diferentes condiciones experimentales. Estos resultados se muestran en la Tabla 1. Es importante reseñar que el NTS comercial es una mezcla de los isómeros 1,3,6 (80%) y 1,3,7 (20%) y que utilizamos el mismo sin purificación previa. Los resultados del análisis de los datos, mostrados en la Tabla 1, se obtuvieron después de calcular la concentración del ligando (NTS), considerando que el 100% de la cantidad pesada es la forma activa del NTS. También calculamos concentraciones de ligando considerando que la forma activa del mismo fuera sólo el 80% de la cantidad pesada. En este caso, los valores obtenidos de los parámetros de la unión fueron similares a los mostrados en la Tabla 1, aunque, en los mismos, los errores fueron más grandes y el error estándar del ajuste, claramente peor en todos los casos. Aunque no se deben extraer

We performed several titrations at different NaCl concentrations and different temperatures, in order to determine the equilibrium constant and enthalpy change under different experimental conditions. These results are also exhibited in Table 1. Importantly, commercial NTS is a mixture of 1,3,6 (80%) and 1,3,7 (20%) isomers and was used in our experiments without further purification. The data analysis results in Table 1 were obtained after calculating the ligand (NTS) concentration in the experiments, considering its active form to be 100% of the weighed amount. We also calculated the ligand concentration considering the active form to be only 80% of the weighed amount. In the latter case, the values obtained for the binding parameters were similar to those gathered in Table 1, although the errors were larger and the standard error of the fit was clearly worse in all cases. No definitive structural conclusions can be made from the goodness of the fit of the thermodynamic data. However, the



conclusiones de carácter estructural a partir de la bondad del ajuste de un experimento de naturaleza termodinámica, el mejor ajuste obtenido cuando se considera que la forma activa del ligando es el 100% de la cantidad pesada sugiere que un grupo sulfonato, en la posición 6 ó 7 de la molécula de naftaleno, no cambia la afinidad del ligando por la proteína. Esto apuntaría, bien a una falta de interacción del grupo sulfonato en cualquiera de dichas posiciones, o a una interacción equivalente, probablemente de naturaleza electrostática, con un grupo equidistante en la molécula de proteína. Comoquiera que el NTS se une al FGfA con el plano aromático perpendicular a la superficie de la proteína<sup>4</sup>, la primera interpretación sería compatible con las posiciones 6 y 7 apuntando hacia la disolución, siendo las posiciones 1 y 3, en el otro extremo de la molécula, las que participarían en la interacción con la proteína. El estudio estructural realizado mediante RMN no pudo establecer de forma concluyente este punto, al no poder la técnica detectar los grupos sulfonato.

Todas las trazas obtenidas en los diferentes experimentos fueron como las mostradas en la parte inferior de la Figura 1. Estas son las trazas características en calorimetría de titulación de interacciones débiles con una constante de unión baja. Las interacciones más fuertes mostrarían un punto de inflexión, que no se observa en ninguna titulación. La capacidad de la calorimetría en la determinación de una constante de equilibrio a partir de una titulación se racionaliza mediante el uso de la llamada “ventana Kc”<sup>13</sup>. Kc es el producto adimensional de la constante de equilibrio (K) y la concentración de macromolécula (c) en el experimento. En el caso particular del instrumento utilizado en este trabajo, el valor mínimo del parámetro Kc, que permite una determinación precisa de la constante de equilibrio, es 1. Dado que los valores de las constantes de equilibrio de la Tabla 1 se encuentran en el rango  $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$  y la concentración inicial de proteína en los diferentes experimentos fue siempre del orden de  $10^{-4} \text{ M}$ , nos encontramos con un valor de Kc de 0,1, por debajo del límite inferior del calorímetro para una buena determinación de la constante de unión. Es por ello que los datos de la Tabla 1 deben ser tratados con cautela. A la vista de ellos, podríamos decir que la constante de unión para la interacción FGfA — NTS es inferior a  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , a la fuerza iónica más baja

better fit of data when the active ligand form is considered as 100% of the weighed amount suggests that a sulfonate group either in position 6 or 7 of the naphthalene molecule does not change the affinity of the ligand for the protein. This would point to a lack of interaction of the sulfonate group at any of these positions or an interaction, more likely of an electrostatic nature, with an equidistant group in the protein molecule. As NTS binds to aFGF with the aromatic plane perpendicular to the protein surface<sup>4</sup>, the first interpretation would be consistent with positions 6 and 7 pointing towards the solution. Positions 1 and 3, at the other end of the molecule, would be those that participate in the interaction with the protein. Because the sulfonate groups are silent, their position was not unambiguously established by the NMR technique used in the structural determination.

All the traces obtained for the different experiments are of the type shown in the lower panel of Figure 1. This is the characteristic trace in titration calorimetry for a weak interaction with a low binding constant. Stronger interactions would show an inflexion point, which was not observed for any titration. The performance of titration calorimetry to determine the binding constant of a reaction from a single titration can be rationalized using the so-called Kc window<sup>13</sup>. This is the adimensional product of the binding equilibrium constant (K) multiplied by the macromolecule concentration (c) in the experiment. In the particular case of the instrument used in this work, 1 is the minimum value of the Kc parameter that allows a precise measurement of K. The values of the equilibrium constants in Table 1 are all in the range  $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$ . The starting protein concentration in the experiments was always close to  $10^{-4} \text{ M}$ . This implies a Kc value of 0.1, below the lower limit of the calorimeter for a good determination of the binding constant. Thus, the parameters collected in Table 1 should be treated with caution. Regarding the binding constant for the aFGF – NTS interaction under the different experimental conditions (see Table), we can only state that it is likely to be below  $10^3 \text{ M}^{-1}$  at the lower ionic strength used, or even below  $10^2 \text{ M}^{-1}$  at the higher ionic strength. We are unable to be more precise. On the other hand, as mentioned above, the NTS binding to aFGF has been studied by NMR<sup>4</sup>. Experimental conditions were 10 mM NaPi (pH 6.0), 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.15 M NaCl, 2 mM NTS

utilizada, o incluso inferior a  $10^2 \text{ M}^{-1}$ , a la fuerza iónica más alta, resultándonos imposible una mayor precisión. Por otra parte, como ya hemos indicado anteriormente, la unión de NTS al FGFa ha sido estudiada mediante RMN (4) a una concentración 1 mM de proteína en NaPi 10 mM (pH 6,0),  $\beta$ -mercaptoethanol 1 mM, NaCl 0,15 M y NTS 2 mM. En estas condiciones, un orden de magnitud en la constante de unión de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  sería compatible con la observación de RMN del NTS unido al FGFa. Esto nos permite una mayor confianza en los resultados obtenidos a la fuerza iónica más baja, 0,15 M de NaCl.

En todo caso, si se consideran los resultados de la Tabla 1, se observa que, desde el punto de vista del error estándar de los ajustes, éstos fueron siempre buenos. El programa podría hacer un buen ajuste de dos parámetros para las curvas elementales obtenidas en nuestros experimentos. Sin embargo, no podemos decir que en el límite inferior de la técnica, como es el presente caso, el programa sea capaz de discriminar entre falsos mínimos locales para la suma de los cuadrados de los residuos.

Un valor de Kc bajo se puede evitar incrementando la concentración de proteína. Sin embargo, esto no fue posible, en nuestro caso, debido a la aparición de un fenómeno de microagregación cuando la concentración de proteína aumenta. Hemos observado un efecto de "salting-in" en el FGFa, cuya solubilidad aumenta con el aumento de la fuerza iónica. Por otra parte, como puede observarse en la Tabla 1, un aumento de la fuerza iónica reduce la afinidad, de tal forma que un posible aumento de la concentración de la proteína, aumentando la fuerza iónica, se vería contrarrestado por una disminución de la constante de unión. Por lo tanto, no fue posible establecer las condiciones experimentales óptimas para la caracterización termodinámica de la unión mediante calorimetría isotérmica de titulación.

A pesar de las limitaciones de nuestros datos, su análisis merece la pena, por lo menos en las condiciones más favorables de fuerza iónica más baja, dada por una concentración de NaCl 0,15 M. De los datos a  $25^\circ\text{C}$  podemos aceptar, a partir de una constante de unión del orden de  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , una estimación del cambio de energía de Gibbs para la interacción de  $-4 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ; la medida directa del cambio de entalpía en el experimento calorimétrico es  $-6 \text{ kcal mol}^{-1}$ . A partir de estos dos valores, podemos calcular un cambio de en-

and 1 mM aFGF. A  $10^3 \text{ M}^{-1}$  order of magnitude in the binding constant allows NMR observation of NTS bound to the protein. Therefore, we can have greater confidence in the results obtained at the lower ionic strength of 0.15 M NaCl.

Nevertheless, consideration of the titrations listed in Table 1 shows that a good data fit was obtained in each case, in terms of the standard error of the fitting. It is likely that the software can achieve a good two-parameter fit for elemental-shape curves such as the ones obtained in our experiments. However, at the lower limit of the technique, as in the present case, the software cannot discriminate among local false minimums for the sum of the squares of the residuals.

A low Kc value can be avoided by increasing the protein concentration. However, this was not possible in the present case because of the occurrence of some micro-aggregation phenomena when the protein concentration is increased. We observed a salting-in effect with aFGF, showing a rise in solubility with increasing ionic strength. However, as can be observed in Table 1, an increase in ionic strength lowers the affinity, so that any increase in the experimental protein concentration would be counteracted by a lower binding constant. Therefore, with the instrument used, it was not possible to establish the experimental conditions for an optimal thermodynamic characterization of the binding by isothermal titration calorimetry.

Despite the limitations of our data, the results are worthy of discussion, at least under the most favorable conditions at the lower ionic strength given by a NaCl concentration of 0.15 M. From the data at  $25^\circ\text{C}$  we can accept, from a binding constant of, say,  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , an estimate of the Gibbs energy change for the interaction of  $-4 \text{ kcal}$

$\text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . The direct measurement of the enthalpy change in the calorimetric experiment is  $-6 \text{ kcal mol}^{-1}$ . From the latter value and that of the Gibbs energy change, an entropy change of  $-7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  can be calculated. Therefore, this is a reaction that is favored by the enthalpy change and in which the entropy change is unfavorable.

We previously carried out calorimetric studies of the interaction of aFGF with heparin<sup>15</sup> and *myo*-inositol hexasulfate<sup>10</sup>, a heparin analog. Both ligands activate the protein and both bind to the same site where NTS produces the opposite effect. A different calorimeter was used in these



tropía de  $-7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Por lo tanto, se trataría de una reacción entálpicamente dirigida, para la que el cambio de entropía es desfavorable.

Hemos realizado otros estudios calorimétricos de la interacción de FGFa con heparina<sup>15</sup> y *myo*-inositol hexasulfato<sup>10</sup>, un análogo de la heparina. Ambos ligandos activan a la proteína y los dos se unen al mismo sitio en el que el NTS produce el efecto contrario. En estos estudios previos se utilizó un calorímetro diferente, en el que no se podía llegar a concentraciones de proteína tan bajas como las del instrumento MCS de este trabajo. Por ello, no fue posible trabajar a NaCl 0,15 M y, para evitar los problemas de microagregación, realizamos los experimentos a concentraciones de sal en el rango 0,2 – 0,6 M. La proteína mostró mayor afinidad por estos dos ligandos a esas fuerzas iónicas, por lo que la termodinámica de la unión se pudo establecer con precisión. Para poder comparar con los resultados obtenidos con NTS, hemos de extrapolar los resultados logrados con heparina y *myo*-inositol hexasulfato a una concentración 0,15 M de NaCl a 25°C. Los cambios en energía de Gibbs, entalpía y entropía fueron  $-6,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-7,1 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $-2 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente, para la heparina, y  $-7,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-5,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente, para el *myo*-inositol hexasulfato. En los tres casos, el cambio de entalpía es favorable a la interacción, con valores similares. El cambio de entropía no es favorable para la interacción con la heparina, como también ocurre con el NTS, pero es claramente favorable en el caso del *myo*-inositol hexasulfato. En su momento propusimos un modelo<sup>10</sup> para la unión de este último ligando, en el que 3-4 iones cloruro se desligan de la superficie de la proteína a raíz de la unión. Esta liberación de iones al medio contribuiría de manera importante al cambio de entropía favorable. Tanto la heparina como el NTS poseen una menor densidad de carga, que les impediría competir con éxito por el mismo número de cloruros que el *myo*-inositol hexasulfato. De hecho, hemos propuesto<sup>15</sup> que sólo 1-2 iones cloruro se desligan del FGFa al producirse la unión de heparina. El menor número de iones que pasan al medio explicaría una contribución menos favorable al cambio de entropía.

La mayor contribución desfavorable de la variación de entropía en la unión del NTS es determinante para la significativa menor afinidad por este ligando en comparación con los otros

earlier studies, in which the lowest attainable protein concentration was not as low as that in the MCS instrument of the present work. As a result, working at 0.15 M NaCl was not possible; therefore, in order to avoid micro-aggregation problems we carried out the experiments at NaCl concentrations in the 0.2 – 0.6 M range. At any rate, the protein showed a higher affinity for these two ligands within this ionic strength range and the thermodynamics for the binding could be precisely determined. To enable comparison with NTS results, we extrapolated the heparin and *myo*-inositol hexasulfate results to 0.15 M NaCl concentration at 25°C. Changes in Gibbs energy, enthalpy, and entropy were  $-6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-7.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , and  $-2 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectively, for heparin, and  $-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , and  $8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectively, for *myo*-inositol hexasulfate. In both cases, there was a favorable enthalpy change for the interaction, as with NTS, and the values were roughly similar in all three cases. The entropy change was not favorable for heparin, similar to the case of NTS, and was clearly favorable for *myo*-inositol hexasulfate. We previously proposed a model<sup>10</sup> for the binding of the latter ligand in which 3-4 chloride ions are released from the protein surface upon binding. This ion release to the surrounding medium would make an important contribution to the favorable entropy change. In the case of heparin and NTS, there is a lower charge density in the ligands, which might not be able to compete for as many ion binding sites on the protein. In fact, we have speculated<sup>15</sup> that only 1-2 chloride ions are released from aFGF upon heparin binding. The fewer ions released to the medium would correlate with a less favorable contribution to the entropy change.

The larger unfavorable entropy contribution to binding for NTS is determinant for its overall significantly lower affinity in comparison with the other two ligands: a Gibbs energy change of  $-4 \text{ kcal mol}^{-1}$  vs.  $-6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  for heparin and  $-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  for *myo*-inositol hexasulfate. This affinity difference with heparin is relevant to the pharmacological application of NTS as an anti-angiogenic agent. Assuming that the polysaccharide is a physiological ligand for aFGF, very high local concentrations of NTS must be reached in order to successfully compete with heparin and inhibit the tumor growth.

dos: un cambio de energía de Gibbs de  $-4 \text{ kcal mol}^{-1}$  versus  $-6,5 \text{ kcal mol}^{-1}$  para la heparina y  $-7,7 \text{ kcal mol}^{-1}$  para el *myo*-inositol hexasulfato. La diferencia de afinidad con la heparina es relevante en el contexto de la posible aplicación farmacológica del NTS como agente antiangiogénico. Suponiendo que el polisacárido fuese un ligando fisiológico para el FGFa, habría que alcanzar concentraciones locales de NTS relativamente altas para poder competir con éxito con la heparina e inhibir el crecimiento del tumor.

En el trabajo de RMN mencionado anteriormente<sup>4</sup>, se estimó para la interacción FGFa – NTS una constante de unión de  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  a partir de un experimento de competición con *myo*-inositol hexasulfato. El valor de esta constante de unión es aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que la medida en este trabajo. No tenemos una explicación inmediata para esta discrepancia. En cualquier caso, consideramos que nuestro método experimental es más directo y, además, utilizamos un sistema purificado hasta homogeneidad. En el experimento de competición, el observable utilizado para la determinación de la constante de unión fue el crecimiento de fibroblastos. Se trata de un sistema muy complejo, alejado del equilibrio, en el que hay que hacer muchas suposiciones para aceptar una proporcionalidad directa entre el crecimiento celular y la unión de NTS al FGFa en el medio extracelular.

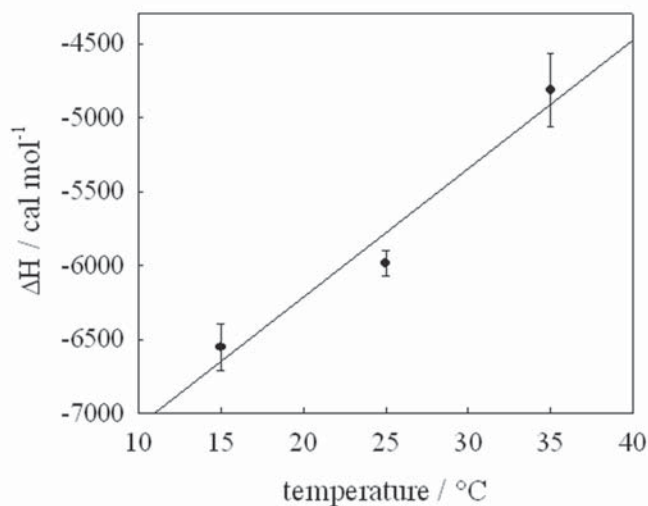
Con respecto a la dependencia con la temperatura de la interacción, la Figura 2 muestra una buena correlación entre la temperatura y los cambios de entalpía medidos en NaCl 0,15 M. A partir de la pendiente, se calculó un cambio en la capacidad calorífica de la reacción de  $90 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . El valor absoluto es pequeño y, lo más interesante del resultado, es el signo positivo, poco habitual en procesos de unión de ligandos a proteínas.

In the NMR work mentioned above<sup>4</sup>, a binding constant for aFGF – NTS interaction of  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  was estimated from a competition experiment with *myo*-inositol hexasulfate. This binding constant is approximately two orders of magnitude larger than the one measured here. We have no immediate explanation for this discrepancy. On the other hand, we consider our experimental approach to be more direct, and we used a system purified to homogeneity. In the competition experiment, the growth of fibroblasts was used as the observable for the determination of the binding constant. In this very complex system, which is far from equilibrium, many assumptions must be made in order to accept a direct proportionality between cell growth and NTS binding to aFGF in the extracellular medium.

With respect to the temperature dependence of the interaction, Figure 2 depicts the good correlation between temperature and the measured enthalpy changes at 0.15 M NaCl. A heat capacity change for the reaction of  $90 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  was measured from the slope. The absolute value is small, and the most interesting finding is the positive sign, rather unusual for a ligand binding process.

**FIGURA 2.** Dependencia con la temperatura del cambio de entalpía para la unión de NTS a FGFa en NaPi 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0. La pendiente de la regresión lineal es 87 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

**FIGURE 2.** Temperature dependence of the enthalpy change for the binding of NTS to aFGF in 20 mM NaPi, 0.15 M NaCl, pH 7.0. The slope of the regression line is 87 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.



El cambio en la capacidad calorífica en una interacción proteína-ligando (o el desplegamiento de una proteína) refleja fundamentalmente la contribución de la hidratación o la interacción con el disolvente. Estudios realizados con compuestos modelo y análisis estructurales de la energética de desnaturalización de proteínas indican que la contribución de la exposición al disolvente es positiva para las cadenas laterales de los aminoácidos no polares y negativas para las de los polares<sup>16-18</sup>. El cambio en entalpía también refleja la hidratación de las cadenas laterales de los aminoácidos, además de existir contribuciones tanto de la formación como de la ruptura de interacciones internas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Freire y colaboradores<sup>19,20</sup> han formulado los cambios, tanto en la capacidad calorífica como en la entalpía, en términos de cambios en la accesibilidad al disolvente de las superficies polar y apolar de la proteína que acompañan al proceso en cuestión, en nuestro caso la unión de un ligando a una proteína:

$$\Delta C_p = 0,45\Delta ASA_{ap} - 0,26\Delta ASA_{pol}.$$

$$\Delta H_{60} = -8,44\Delta ASA_{ap} + 31,4\Delta ASA_{pol}.$$

The change in heat capacity brought about by a protein-ligand interaction (or the unfolding of a protein) mainly reflects the contribution of hydration, or interaction with the solvent. Studies with model compounds and structural analyses of protein denaturation energetics indicate that the contribution of solvent exposure is positive for apolar amino acid side chains and negative for polar ones<sup>16-18</sup>. The change in enthalpy also reflects the hydration of the amino acid side chains, together with contributions from either the breakdown or formation of internal interactions of van der Waals and hydrogen bonds. Freire and co-workers<sup>19,20</sup> have formulated the changes in both heat capacity and enthalpy in terms of changes in accessible polar and apolar areas accompanying the process in question, in our case the binding of a ligand to a protein:

$$\Delta C_p = 0,45 \Delta ASA_{ap} - 0,26 \Delta ASA_{pol}.$$

$$\Delta H_{60} = -8,44 \Delta ASA_{ap} + 31,4 \Delta ASA_{pol}.$$

where  $ASA_{ap}$  and  $\Delta ASA_{pol}$  are, respectively, the changes in apolar and polar areas accessible to the solvent (in Å<sup>2</sup>).  $\Delta C_p$  is given in cal K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>.

donde  $\Delta ASA_{ap}$  y  $\Delta ASA_{pol}$  son, respectivamente, los cambios en la accesibilidad al disolvente de las áreas apolares y polares (en  $\text{Å}^2$ ).  $\Delta C_p$  viene dado en  $\text{cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ .  $\Delta H_{60}$  es el cambio de entalpía a  $60^\circ\text{C}$  y viene dado en  $\text{cal mol}^{-1}$ . Se toma  $60^\circ\text{C}$  como la temperatura de referencia porque es aproximadamente la temperatura media de desnaturalización de las proteínas modelo utilizadas en el análisis<sup>20</sup>. A partir de la regresión lineal de la Figura 2, se calculó un  $\Delta H_{60}$  de  $-2,8 \text{ kcal mol}^{-1}$  para la unión del NTS al FGFa. Por lo tanto, planteamos un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, a partir del cual calculamos los siguientes valores:

$$\Delta ASA_{ap} = -170 \text{ Å}^2 \text{ y } \Delta ASA_{pol} = -40 \text{ Å}^2.$$

Los cambios de accesibilidad al disolvente de los dos tipos de áreas se pudieron medir a partir de los resultados obtenidos con FGFa libre<sup>21</sup> y FGFa unido a NTS<sup>4</sup>. Usando 26 estructuras para cada caso, determinamos un valor de  $-463 \pm 191 \text{ Å}^2$  para el cambio de superficie apolar y un valor de  $-292 \pm 144 \text{ Å}^2$  para el cambio de superficie polar. Estos valores son algo mayores que los calculados a partir de las medidas termodinámicas, aunque debemos considerar que se trata de valores pequeños en ambos casos, lo que implica un cambio conformacional global pequeño. Por otra parte, es imposible determinar la precisión de los cambios superficiales calculados a partir de los parámetros termodinámicos, ya que no podemos conocer la precisión de estos últimos, al estar trabajando en los límites del instrumento, tal como indicamos antes. Como cabría esperar errores grandes, es probable que los mismos solapen con los errores de los cambios en las superficies obtenidos a partir de las medidas estructurales. En tal caso, no habría diferencias significativas entre los dos conjuntos de valores. Si las discrepancias entre ellos lo fueran, podrían atribuirse a la participación del anillo aromático del naftaleno en la interacción. Este tipo de interacción no se consideró en el establecimiento, a partir de datos termodinámicos de desplegamiento de proteínas, de las ecuaciones paramétricas utilizadas.

La Figura 3 muestra una descripción detallada de cómo los cambios de superficie accesible al disolvente afectan a los residuos individuales de los aminoácidos en la molécula de FGFa. Consideramos significativos aquellos cambios en los que el valor cero de  $\Delta ASA$  se encontraba fuera de la barra de error estándar, que observamos se

$\Delta H_{60}$  is the change in enthalpy at  $60^\circ\text{C}$  and is given in  $\text{cal mol}^{-1}$ .  $60^\circ\text{C}$  is the reference temperature because it is the approximate average denaturation temperature of the model proteins used in the analysis<sup>20</sup>. A  $\Delta H_{60}$  of  $-2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  for the binding of NTS to aFGF was calculated from the regression line in Figure 2. Thus, we obtained a system of two equations with two unknowns, from which we calculated an  $\Delta ASA_{ap}$  of  $-170 \text{ Å}^2$  and an  $\Delta ASA_{pol}$  of  $-40 \text{ Å}^2$ .

Changes in accessible surface areas upon binding were measured from NMR studies of the structure of free<sup>21</sup> and NTS-bound aFGF (4). Using 26 molecular dynamics structures for each case, we determined a value of  $-463 \pm 191 \text{ Å}^2$  for the change in apolar surface area and a value of  $-292 \pm 144 \text{ Å}^2$  for the change in polar surface area. These are somewhat higher than the values calculated from thermodynamic measurements, although it must be born in mind that we are dealing with small changes in both cases, which imply little overall conformational change. On the other hand, we were unable to determine the precision of the surface area changes calculated from thermodynamic parameters, as we can not know properly the precision in these, because we were working at the limits of the instrument, as reported above. As we would expect a large size of the errors, it is likely that they overlap with the errors in the surface area changes measured from structural data. If this were the case, our interpretation would be that there are no significant differences between the two sets of values. If the discrepancies between them were significant, they could possibly be attributed to the participation of an aromatic naphthalene ring in the interaction in question. This type of interaction was not considered in the development, from protein unfolding thermodynamics, of the parametric equations used.

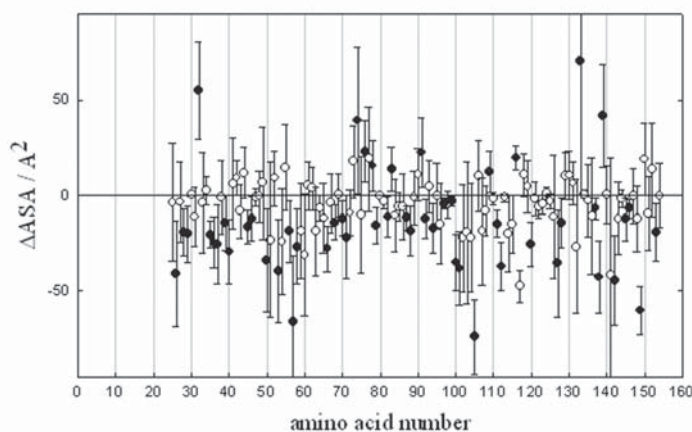
Figure 3 provides a detailed description of how the changes in accessible surface area affected individual amino acid residues in the aFGF molecule. Changes in which the zero value of  $\Delta ASA$  was outside the standard error bar were considered significant. Widespread significant changes can be observed across the whole aFGF molecule. This markedly contrasts with the interaction of the activator *myo*-inositol hexasulfate with aFGF, when significant changes in ASA (10) only occurred at two very well defined sites: in the amino acid cluster (glutamine 57, together with

encuentran ampliamente distribuidos en toda la molécula de FGFa. Esto contrasta notablemente con la interacción del activador *myo*-inositol hexasulfato con FGFa, donde los cambios significativos en ASA<sup>10</sup> se encuentran localizados en dos sitios muy bien definidos: en el “cluster” de aminoácidos (glutamina 57, junto con los adyacentes isoleucina 56 y leucina 58) situado al final de la lámina  $\alpha$ 4 y en el residuo leucina 149, en la región de unión al receptor de alta afinidad. Todos los cambios en estos casos fueron negativos, mientras que para el NTS se observaron cambios significativos de ambos signos, con un cambio global ligeramente negativo, como en el caso del *myo*-inositol hexasulfato. Esta amplia extensión de cambios significativos de ambos signos es consistente con la observada mayor flexibilidad de la molécula de FGFa con NTS unido frente a la de la proteína con *myo*-inositol hexasulfato unido<sup>4</sup>. La segunda es más compacta que la primera y, a su vez, ambas estructuras son más compactas que la proteína libre.

adjacent amino acids isoleucine 56 and leucine 58) at the end of the  $\alpha$ 4 strand; and in leucine 149 residue, in the high affinity receptor binding region. These were all negative changes, whereas significant changes of both signs were observed for NTS, with a small overall negative change, as in the case of *myo*-inositol hexasulfate. Such a widespread extension of significant changes of both signs is consistent with the observed higher flexibility of the NTS bound aFGF molecule vs. the *myo*-inositol hexasulfate bound one<sup>4</sup>. The latter is tighter than the former, although both structures are tighter than free protein.

**FIGURA 3.** Cambios en la superficie accesible al disolvente de los aminoácidos del FGFa con la unión del 1,3,6-naftalén trisulfonato. Los residuos en la proteína se han numerado de acuerdo con su posición en la estructura primaria de la forma de 154 aminoácidos (11).

**FIGURE 3.** Change in accessible surface area for aFGF amino acids on 1,3,6-naphthalene trisulfonate binding. Residues in the protein are numbered according to their position in the primary structure of the 154 amino acid form (11).





Los cambios significativos a lo ancho de toda la superficie de la proteína hacen difícil apuntar a sitios particulares que puedan arrojar luz sobre el mecanismo de acción del NTS. Esta falta de definición, en términos estructurales, de la acción del NTS, así como su baja afinidad por la proteína, de la que hemos hablado anteriormente, apuntan a que el NTS quizás no sea un buen agente antiangiogénico.

En cualquier caso, el NTS sí se podría considerar como una molécula líder para el desarrollo de fármacos antiangiogénicos. El primer paso consistiría en aumentar la afinidad por la proteína. En el análisis que sigue vamos a seguir las ideas desarrolladas también por Freire y colaboradores<sup>8</sup> relacionadas con la aplicación de métodos termodinámicos al diseño de fármacos. Desde un punto de vista termodinámico, la afinidad en la unión se define en términos de la energía de Gibbs de unión:

$$K = e^{-\Delta G/RT}$$

donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. La energía de Gibbs de unión viene, a su vez, definida por los cambios de entalpía ( $\Delta H$ ) y de entropía ( $\Delta S$ ):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Por consiguiente,

$$K = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/RT} = e^{-\Delta H/RT} e^{\Delta S/R}$$

Por lo tanto, la afinidad se puede optimizar haciendo  $\Delta H$  más negativo,  $\Delta S$  más positivo o ambas cosas a la vez. Nosotros hemos encontrado para la unión de NTS a FGFa un buen valor negativo para el cambio de entalpía, siendo el valor negativo del cambio de entropía el responsable de la baja afinidad. Por lo tanto, la optimización de la molécula líder NTS tendrá que ser entrópicamente dirigida, es decir, las modificaciones estructurales deben hacerse para modificar el cambio de entropía hacia valores positivos.

El cambio de entropía en la interacción de una proteína con un ligando pequeño es la suma de tres términos: uno relacionado con los cambios de hidratación o la interacción con el disolvente (primariamente alrededor de los grupos polares y apolares, como en las ecuaciones paramétricas de los cambios de entalpía y de la capacidad calorífica, ya consideradas); otro término relacionado con los cambios conformacionales y un tercero relacionado con la pérdida de entropía translacional, producida como consecuencia de la unión. Con respecto a este último término, se ha encontrado<sup>22</sup> que el valor que mejor explica los

The significant changes across the whole protein surface make it difficult to pinpoint particular sites that could provide clues about the mechanism of action of NTS. This lack of definition of NTS action in structural terms, together with the low affinity for the protein reported above, may rule NTS out as an anti-angiogenic agent.

However, NTS can still be considered as a lead for the development of other anti-angiogenic drugs. The first goal in this development would be to increase the affinity for the protein. The following discussion concerns the ideas developed, again by Freire and co-workers<sup>8</sup>, regarding the application of thermodynamic methods in drug design. From a thermodynamic point of view, the binding affinity is defined in terms of the Gibbs energy of binding

$$K = e^{-\Delta G/RT}$$

where R is the gas constant and T the absolute temperature. The Gibbs energy of binding is, in turn, defined by the enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) changes

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Therefore

$$K = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/RT} = e^{-\Delta H/RT} e^{\Delta S/R}$$

Thus, the binding affinity can be optimized by making  $\Delta H$  more negative,  $\Delta S$  more positive, or both. We found a good negative value for the enthalpy change in the NTS binding with aFGF, and the negative value for the entropy was responsible for the low ligand affinity. In this case, lead optimization has to be entropy driven, i.e., structural modifications in the lead must be directed to modifying the entropy change towards the positive values.

The entropy change for the interaction of a protein with a small ligand is the sum of three terms: one term related to changes in hydration or interaction with the solvent (primarily around apolar and polar groups, as in the parametric equations for the enthalpy and heat capacity changes considered above); another term related to conformational changes; and a third related to the loss of translational entropy upon binding. Regarding this last term, it has been found<sup>22</sup> that the value that best accounts for experimental results is the cratic entropy value of  $-8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  proposed by Kauzmann<sup>23</sup>. In entropy-driven lead optimization, this term remains the same, both in the lead and in the modified molecule, so that attention must be directed to the other two terms. With respect to the conformational

resultados experimentales es el de  $-8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , propuesto por Kauzmann<sup>23</sup>. En una optimización entrópicamente dirigida, este término permanecería igual tanto en la molécula líder como en la modificada, por lo que la atención se debe dirigir a los otros dos términos. Con respecto al término que tiene en cuenta la entropía conformacional, la mayor flexibilidad en las moléculas interaccionantes actuaría en contra de la afinidad, ya que existe una pérdida de entropía ( $\Delta S < 0$ ) asociada a la pérdida de flexibilidad que acompaña a la unión. Para la mejora de la molécula líder es deseable, por lo tanto, una mayor rigidez de la misma. Finalmente, en relación al término que tiene en cuenta la entropía del disolvente, está claro que la hidrofobicidad del ligando favorece la interacción, ya que existe una clara ganancia en entropía por parte del disolvente como consecuencia de la unión ( $\Delta S > 0$ ).

El cambio de entropía medido en la unión del NTS al FGFa de  $-7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  es muy próximo al valor aceptado de  $-8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  para el término de entropía translacional. Dado que el cambio conformacional de la proteína en la unión es pequeño y el ligando es bastante rígido, es probable que el término de cambio de entropía conformacional tenga un bajo valor absoluto, lo que implicaría un valor absoluto también bajo para el término del cambio de entropía del disolvente. En una optimización del ligando entrópicamente dirigida, hay poca esperanza en mejorar el cambio de entropía conformacional en la dirección adecuada, incrementando la rigidez de la molécula de NTS, ya de por sí poco flexible. Por lo tanto, sólo podemos considerar el término del cambio de entropía asociado a la interacción con el disolvente para la mejora de la molécula líder. Como hemos dicho, esto se puede lograr aumentando su hidrofobicidad. En general, los grupos sulfonatos, cargados y grandes, hacen de los naftalénsulfonatos moléculas altamente hidrofílicas. Dado que éste es el caso del NTS, el término del cambio de entropía referente a la interacción con el disolvente no favorece la afinidad. Para modificar este término hacia valores positivos, logrando un cambio global de la entropía que contribuya positivamente a la afinidad de la unión, hay que aumentar la hidrofobicidad del ligando. Ello se puede lograr mediante la eliminación de grupos sulfonato, manteniendo alguna polaridad en la molécula que asegure su solubilidad en agua. Este sería

entropía term, flexibility in the interacting molecules acts against binding, because there is an entropy loss ( $\Delta S < 0$ ) associated with the loss of flexibility when binding occurs. For lead optimization, therefore, higher rigidity must be aimed for in both the protein and the ligand. Finally, regarding the solvent entropy term, it is clear that hydrophobicity of the ligand favors the interaction, as there is a clear gain in solvent entropy upon binding ( $\Delta S > 0$ ).

The entropy change measured in NTS binding to aFGF of  $-7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  is very close to the accepted value of  $-8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  for the translational entropy term. Because the protein presented small overall conformational change and the ligand is fairly rigid, the conformational entropy term is likely to have a small absolute value, which would also imply a small absolute value for the solvent entropy term. In an entropy-based ligand optimization, there is little scope for changing the conformational entropy in the desired direction by increasing the rigidity of the NTS molecule, already not very flexible. Therefore, the solvent entropy term is the only one that can be considered for improving the lead molecule. As mentioned above, this can be achieved by increasing its hydrophobicity. In general, bulky charged sulfonate groups make all naphthalene sulfonates highly hydrophilic. Because this is the case for NTS, the solvent entropy term does not favor the binding affinity. In order to change this term towards positive values, achieving an overall entropy change that contributes positively to the binding affinity, the hydrophobicity of the ligand must be increased. This increase could be accomplished by the elimination of sulfonate groups, maintaining some polarity in the molecule to avoid water insolubility. This would be the case for 5-amino-2-naphthalene sulfonate, a related molecule that has proven to be an effective angiogenesis inhibitor<sup>24</sup>. This represents a good example of drug design rationalized through energetic knowledge. The interaction of 5-amino-2-naphthalene sulfonate with aFGF has been recently studied from a structural point of view<sup>24</sup>, and its thermodynamic characterization is in progress.

el caso del 5-amino-2-naftaleno sulfonato, una molécula relacionada que ha resultado ser un eficaz inhibidor de la angiogénesis<sup>24</sup>. Este sería un buen ejemplo de diseño de fármacos racionalizado a partir del conocimiento energético. Para comprobar la validez de las ideas anteriores, en estos momentos procedemos a la caracterización termodinámica de la interacción del 5-amino-2-naftalén sulfonato con FGFa, habiéndose realizado ya el estudio estructural<sup>24</sup>.

## REFERENCIAS/REFERENCES

1. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(2):494-8.
2. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2(3):3005.1-3005.12.
3. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
4. Lozano RM, Jimenez M, Santoro J, Rico M, Gimenez-Gallego G. Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3, 6-naphthalenetrisulfonate: a minimal model for the anti-tumoral action of suramins and suradistas. *J Mol Biol* 1998;281(5):899-915.
5. Cuevas P, Carceller F, Reimers D, Cuevas B, Lozano RM, Gimenez-Gallego G. Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol Res* 1999;21(5):481-7.
6. Cuevas P, Lozano RM, Gimenez-Gallego G. Suppression of acidic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis by the antigrowth activity of 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol Res* 1999;21(2):191-4.
7. Pineda-Lucena A, Jimenez MA, Nieto JL, Santoro J, Rico M, Gimenez-Gallego G. 1H-NMR assignment and solution structure of human acidic fibroblast growth factor activated by inositol hexasulfate. *J Mol Biol* 1994;242(1):81-98.
8. Velazquez-Campoy A, Luque I, Freire EU-hwscsaBT-HB-Febdbc. The application of thermodynamic methods in drug design. *Thermochimica Acta* 2001;380(2):217-227.
9. Ortega S, Garcia JL, Zazo M, Varela J, Munoz-Willery I, Cuevas P, et al. Single-step purification on DEAE-sephacel of recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(7):795-8.
10. Guzman-Casado M, Sanchez-Ruiz JM, El Harrou M, Gimenez-Gallego G, Parody-Morreale A. Energetics of myo-inositol hexasulfate binding to human acidic fibroblast growth factor effect of ionic strength and temperature. *Eur J Biochem* 2000;267(12):3477-86.
11. Zazo M, Lozano RM, Ortega S, Varela J, Diaz-Orejas R, Ramirez JM, et al. High-level synthesis in *Escherichia coli* of shortened and full-length human acidic fibroblast growth factor and purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene* 1992;113(2):231-8.
12. Copeland RA, Ji H, Halfpenny AJ, Williams RW, Thompson KC, Herber WK, et al. The structure of human acidic fibroblast growth factor and its interaction with heparin. *Arch Biochem Biophys* 1991;289(1):53-61.
13. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989;179(1):131-7.
14. Shrake A, Rupley JA. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J Mol Biol* 1973;79(2):351-71.
15. Guzman-Casado M, Garcia-Mira MM, Sanchez-Ruiz JM, Gimenez-Gallego G, Parody-Morreale A. Energetics of heparin binding to human acidic fibroblast growth factor. *Int J Biol Macromol* 2002;31(1-3):45-54.
16. Spolar RS, Livingstone JR, Record MT, Jr. Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* 1992;31(16):3947-55.
17. Murphy KP, Bhakuni V, Xie D, Freire E. Molecular basis of co-operativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates. *J Mol Biol* 1992;227(1):293-306.
18. Makhatadze GI, Privalov PL. Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* 1995;47:307-425.
19. Gomez J, Hilser VJ, Xie D, Freire E. The heat capacity of proteins. *Proteins* 1995;22(4):404-12.
20. Hilser VJ, Gomez J, Freire E. The enthalpy change in protein folding and binding: refinement of parameters for structure-based calculations. *Proteins* 1996;26(2):123-33.
21. Pineda-Lucena A, Jimenez MA, Lozano RM, Nieto JL, Santoro J, Rico M, et al. Three-dimensional structure of acidic fibroblast growth factor in solution: effects of binding to a heparin functional analog. *J Mol Biol* 1996;264(1):162-78.
22. Luque I, Freire E. Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol* 1998;295:100-27.

23. Kauzmann W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry* 1959;14:1-63.
24. Fernandez-Tornero C, Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Gomez AM, Lopez JC, Quesada E, et al. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity: crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalene sulfonate. *J Biol Chem* 2003;278(24):21774-81.