



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Drug-target residence time : a case for the adenosine A1 and A2A receptors

Guo, D.

Citation

Guo, D. (2014, June 25). *Drug-target residence time : a case for the adenosine A1 and A2A receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/26833>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/26833>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/26833> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Guo, Dong

Title: Drug-target residence time : a case for the adenosine A1 and A2A receptors

Issue Date: 2014-06-25

Samenvatting

Dit proefschrift begint met een beschrijving van het huidige proces van geneesmiddelontwikkeling en het hoge percentage van kandidaat geneesmiddelen dat voor lancering op de markt faalt (hoofdstuk 1). Gebrek aan klinische werkzaamheid is gerapporteerd als de belangrijkste oorzaak voor het falen van geneesmiddelontwikkeling. Al eerder is aangetoond, dat met behulp van de bindingskinetiek beter voorspeld kan worden welke kandidaat geneesmiddelen een goede werking zullen hebben dan met bestaande parameters, welke onder evenwichtscondities bepaald worden (K_i of IC_{50}). De adenosine A_1 en A_{2A} receptoren werden gekozen als twee prototypische receptoren (G protein-coupled receptors of afgekort GPCRs) voor dit proefschrift, omdat door decennia van farmacochemische inspanningen al veel liganden voor deze receptoren ontwikkeld zijn. Deze chemische verbindingen waren goede aanknopingspunten voor het onderzoeken van de kinetiek van ligand-receptor binding.

In hoofdstuk 2 wordt een reeks prototypische GPCR liganden beschreven waarvan kinetische informatie beschikbaar is in de literatuur. Hierna volgt een uitvoerige beschrijving van het kinetische gedrag van GPCR liganden op vier representatieve GPCRs; de muscarine M_3 , de tachykinine NK_1 , de dopamine D_2 en corticotropine releasing CRF_1 receptoren. Het blijkt dat tijdens de vroege fasen van geneesmiddelontwikkeling veel minder kinetische gegevens beschikbaar zijn in vergelijking tot data bepaald onder evenwichtscondities. Daarom zijn er nog bijna geen gedetailleerde structuur-kinetiek relaties (SKR) gerapporteerd, terwijl al decennia lang structuur-affiniteit relaties (SAR) bepaald worden.

Hoofdstuk 3 omvat de opzet, validatie en optimalisatie van een nieuwe kinetische methode voor ligand screening, de zogenaamde twee-punts competitie associatie test. Deze methode zorgt voor een snelle en high-throughput screening, omdat het slechts een meting van radioligand binding op twee verschillende tijdstippen vereist. Zo bepaalt een dual-point meting de kinetic rate index (KRI), een parameter die door ons werd ontwikkeld voor het snel beoordelen van ligand-receptor bindingskinetiek.

In dit hoofdstuk wordt een selectie van 35 A_1 receptor antagonisten met hoge affiniteit beschreven. Zeven verbindingen werden geïdentificeerd met een KRI-waarde boven de 1.2, wat wijst op een relatief langzame dissociatie van de receptor. Alle andere verbindingen hadden een KRI-waarde lager of gelijk aan 1.0, wat een relatief snelle dissociatiesnelheid voorspelt. Verscheidene van deze verbindingen werden geselecteerd voor vervolgstudies waarin dissociatiesnelheden met behulp van kinetische bindingsexperimenten werden bepaald. Het bleek dat deze dissociatiesnelheden overeenkomen met de eerder bepaalde KRI waarden. De KRI en de dual-point meting zijn dus in staat een robuuste voorspelling van de dissociatiesnelheid van het onderzochte ongelabelde ligand te geven. Deze test kan, naast adenosine receptoren, ook op andere GPCRs en aangrijpingspunten voor geneesmiddelen worden toegepast.

In hoofdstuk 4 wordt een uitgebreide SKR studie van de A_{2A} receptor beschreven naast een traditionele SAR studie – een combinatiestrategie zoals beschreven in hoofdstuk 2. De groep van 24 A_{2A} receptor antagonisten, alle ZM241385 derivaten, vertoont geen, of slechts kleine, verschillen in de affiniteit, terwijl aanzienlijke variatie in dissociatiesnelheden werd gevonden. Wij denken dat een dergelijke combinatie van SKR en SAR analyse op de A_{2A} receptor ook van groot belang kan zijn voor andere GPCRs en aangrijpingspunten voor geneesmiddelen. Dan kan het dienen als een nieuwe strategie voor het op maat maken van de interactie tussen een ligand en zijn receptor.

Een verkenning van de moleculaire grondslag van de werkzaamheid van liganden (*in vitro*) wordt beschreven in hoofdstuk 5. In dit hoofdstuk werd de bindingskinetiek van tien A_{2A} receptor agonisten uit verschillende chemische klassen bepaald en werd de relatie met hun functionele effectiviteit onderzocht. De bindingskinetiek van de agonisten werd bepaald met behulp van de competitie associatie test. De functionele werkzaamheid werd gemeten met een label-vrije - op elektrische weerstand gebaseerde - methode en in een cAMP test. Er werd een correlatie gevonden tussen de effectiviteit van de liganden in de functionele experimenten en hun bindingskinetiek.

Door het concept van allosterische modulatie van de A_1 receptor te benaderen vanuit het perspectief van bindingskinetiek waren we in staat om de moleculaire basis van allosterische modulatie beter te begrijpen (hoofdstuk 6). We toonden aan dat een allosterische modulator zowel de associatie- als de dissociatiesnelheid van het orthostere ligand kan veranderen. Het effect op de associatiesnelheid is in de literatuur nog zeer weinig beschreven. Dit effect bleek zowel structuur- als de concentratieafhankelijk.

Dit hoofdstuk bevat ook een onderzoek naar de bindingskinetiek van twee

bitopische liganden, LUF6234 en LUF6258, welke bestaan uit een allosteren en een orthostere farmacofoor verbonden via een linker. Het covalent koppelen van beide delen van een molecuul had een aanzienlijk effect op de totale associatie- en dissociatiesnelheden. Door een wiskundig model te gebruiken om de bindingskinetiek te analyseren waren we in staat een schat aan kennis toe te voegen aan de huidige farmacologische receptorconcepten.

Tot slot wordt een overzicht gegeven van de conclusies die zijn verkregen uit het in dit proefschrift beschreven onderzoek (hoofdstuk 7). Daarnaast worden toekomstperspectieven besproken. Kort samengevat geeft dit proefschrift inzichten in de bindingskinetiek van geneesmiddelen op hun aangrijpingspunt. We hopen dat dit proefschrift meer aandacht vestigt op het belang van het evalueren van bindingskinetiek voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Dit zal hopelijk leiden tot andere en mogelijk betere kandidaat geneesmiddelen voor toekomstige klinische toepassingen.

