



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Allosteric modulation and ligand binding kinetics at the Kv11.1 channel**

Yu, Z.

### **Citation**

Yu, Z. (2015, October 20). *Allosteric modulation and ligand binding kinetics at the Kv11.1 channel*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/35951>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/35951>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/35951> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Yu, Zhiyi

**Title:** Allosteric modulation and ligand binding kinetics at the Kv11.1 channel

**Issue Date:** 2015-10-20

# Samenvatting

De familie van ionkanalen is vanwege zijn vele fysiologische functies al vele jaren een belangrijk aandachtsgebied voor onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen. Helaas is gebleken dat verscheidene geneesmiddelen bijwerkingen vertonen die veroorzaakt worden door binding aan een ionkanaal, in het bijzonder door  $K_v11.1$  kanaal-gemedieerde cardiotoxiciteit. Daarom wordt er tegenwoordig door geneesmiddelautoriteiten onderzoek naar ionkanaal-interacties vereist voordat goedkeuring van een geneesmiddel kan plaatsvinden. Bovengenoemde onderwerpen worden besproken in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift.

**Hoofdstuk 2** is een literatuurstudie die de voortgang van onderzoek naar het  $K_v11.1$  kanaal beschrijft. In dit hoofdstuk hebben we ons gericht op kinetische studies van het ionkanaal, in het bijzonder de unieke kanaalkinetiek en ligand-bindingskinetiek. Daarnaast worden biosynthese, degradatie, structurele eigenschappen, fysiologische functies en on- en off-target toepassingen van het  $K_v11.1$  kanaal geïntroduceerd. Het grondig bestuderen van het  $K_v11.1$  kanaal draagt bij aan het verbeteren van geneesmiddelonderzoek en het verminderen van aritmische bijwerkingen die veroorzaakt worden door blokkering van dit ionkanaal.

In **hoofdstuk 3** is een selectie van eerder beschreven liganden, kalium ionen en drie referentie liganden onderzocht. Voor de geselecteerde stoffen is gekeken naar allosterische modulatie van het  $K_v11.1$  kanaal in [ $^3\text{H}$ ]astemizol en [ $^3\text{H}$ ]dofetilide bindingsstudies. In een radioligand dissociatie studie werd gevonden dat één ligand, LUF6200, een potente negatieve allosterische modulator is en dat kaliumionen zich als positieve allosterische modulatoren gedragen. Deze twee modulatoren induceren hun effect op het  $K_v11.1$  kanaal via verschillende allosterische bindingsplaatsen met een positieve coöperativiteit. Samengevat levert dit onderzoek direct bewijs voor allosterische modulatie van het  $K_v11.1$  kanaal.

Als toevoeging op het in hoofdstuk 3 beschreven onderzoek zijn in **hoofdstuk 4** met behulp van verschillende [ $^3\text{H}$ ]dofetilide experimenten drie liganden, ML-T531, VU0405601 en LUF7244, uitgebreid onderzocht op hun negatieve allosterische eigenschappen ten opzichte van het  $K_v11.1$  kanaal. De nieuwe modulator LUF7244 werd daarnaast verder onderzocht op een potentieel antiaritmisch effect met behulp van radioligand bindingsstudies en een nieuw gevalideerd model, het neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) model. De affiniteit van drie blockbuster geneesmiddelen (astemizol, sertindol en cisapride) die vanwege  $K_v11.1$  kanaal blokkering van de markt gehaald zijn, was verminderd in aanwezigheid

van LUF7244. Daarnaast werden de heterogene verlenging van de duur van de actiepotentiaal en/of een hoge incidentie van vroege napolarisaties (door enkel astemizol en sertindol) - veroorzaakt door deze blockbuster geneesmiddelen - genormaliseerd door voorbehandeling van de NRVM culturen met 10  $\mu\text{M}$  LUF7244. Intrigerend genoeg heeft LUF7244 op zichzelf geen effect op de duur van de actiepotentiaal en op de levensvatbaarheid, prikkelbaarheid en contractiliteit van cardiomyocyten. Daarnaast vertoont het geen effect op de gewenste werking van astemizol, namelijk blokkering van de histamine  $H_1$  receptor. Deze resultaten tonen aan dat verdere ontwikkeling van LUF7244 de mogelijkheid biedt om antiaritmische geneesmiddelen te gebruiken als combinatietherapie.

Vervolgens beschrijft **hoofdstuk 5** de synthese en allosterische evaluatie van 29 liganden met een scaffold gelijk aan LUF7244. De meeste liganden bleken negatieve allosterische modulators voor de blokkering van het  $K_v11.1$  kanaal en structuur-activiteit relaties van al deze liganden werden beschreven. Liganden **7f** en **7p** bleken potenter dan LUF7244 in het negatief moduleren van de receptor. Dit is veelbelovend omdat het laat zien dat deze stoffen mogelijk betere antiaritmische eigenschappen hebben dan LUF7244.

De ontwikkeling van een nieuw [ $^3\text{H}$ ]dofetilide competitie experiment is beschreven in **hoofdstuk 6**. Dit experiment werd vervolgens verder gebruikt om de kinetische parameters van vijftien prototypische  $K_v11.1$  kanaal-blokkers te bepalen. In tegenstelling tot het klassieke mechanisme van ligand-receptor interactie werd de affiniteit van deze blokkers voornamelijk bepaald door hun associatie-snelheidsconstanten in plaats van hun dissociatie-snelheidsconstanten. Dit toont duidelijk de rol en het belang van associatie-snelheidsconstanten voor blokkering van het  $K_v11.1$  kanaal. Vervolgens is voor al deze liganden de affiniteit voor het celmembraan bepaald met behulp van een geïmmobiliseerde kunstmatige membraankolom in een HPLC machine. Net zoals voor gebruikelijke fysisch-chemische eigenschappen is in hoofdstuk 6 aangetoond dat de membraaninteractie van  $K_v11.1$  kanaal-blokkers geen significant effect heeft op hun affiniteit en kinetiek van ligandbinding.

Vanwege het feit dat de dissociatie-snelheidsconstanten en verblijftijden van alle in hoofdstuk 6 beschreven  $K_v11.1$  kanaal-blokkers slechts maximaal een factor 10 verschillen, werd in **hoofdstuk 7** een bibliotheek van 46 liganden getest op affiniteit en kinetiek. Er werden  $K_v11.1$  kanaal-blokkers ontdekt met een 300-voudig verschil in verblijftijd op het ionkanaal, 0.34 min voor **37** t.o.v. 105 min voor **38**. Dit maakte het voor ons mogelijk om structuur-kinetiek relaties te bestuderen naast de gebruikelijke structuur-affiniteit relaties. Vervolgens is op basis van de kinetische parameters van deze liganden samen met die van de referentie liganden, astemizol, ranolazine en dofetilide, een kinetische " $k_{\text{on}}-k_{\text{off}}-K_D$ "-

kaart gemaakt. Deze kaart biedt kader voor een verdere en nauwkeuriger indeling van  $K_v11.1$  kanaal-blokkers waarmee de risico's van de verschillende blokkers voorspeld kunnen worden. In aanvulling hierop zijn twee representatieve liganden, **21** en **38**, getest in een whole-cell patch clamp experiment. Het bleek dat de potentie van deze liganden ( $IC_{50}$ ) werd beïnvloed door hun verblijftijd op het ionkanaal, terwijl de  $I_{Kr}$  inhibition rates in lijn waren met de associatie-snelheidsconstanten. Om bovengenoemde redenen raden wij sterk aan om bij het bepalen van de veiligheid van potentieel pro-aritmische liganden de verblijftijd en associatie-snelheidsconstante naast de affiniteit mee te nemen ter evaluatie.

Ten slotte zijn de algemene conclusies van de hoofdstukken en de bijbehorende mogelijkheden voor toekomstig onderzoek beschreven in **hoofdstuk 8**. Concluderend, allosterische modulatie en ligandbindingskinetiek van het  $K_v11.1$  kanaal zijn uitvoerig beschreven en bediscussieerd in dit proefschrift. Negatieve allosterische modulators bieden nieuwe mogelijkheden tot het verminderen van onbedoelde, aritmische effecten van kandidaat-geneesmiddelen via farmacologische combinatietherapie. Daarnaast kan het gebruikmaken van ligandbindingskinetiek, parallel aan de affiniteit, van het  $K_v11.1$  kanaal in de nieuwe FDA guideline Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) leiden tot verbetering van de traditionele bepaling van toxiciteit veroorzaakt door het  $K_v11.1$  kanaal. Hopelijk zal het evalueren van kinetische parameters van  $K_v11.1$  kanaal-blokkers in de toekomst leiden tot het ontwikkelen van veiliger geneesmiddelen en tot minder geneesmiddelen die van de markt gehaald moeten worden.

