



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Corpora non agunt nisi fixata : ligand receptor binding kinetics in G protein-coupled receptors**

Xia, L.

### **Citation**

Xia, L. (2018, May 30). *Corpora non agunt nisi fixata : ligand receptor binding kinetics in G protein-coupled receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62615>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62615>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62615> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Xia, L.

**Title:** Corpora non agunt nisi fixata : ligand receptor binding kinetics in G protein-coupled receptors

**Issue Date:** 2018-05-30

## Samenvatting

### Samenvatting

Dit proefschrift richt zich op het farmacologische concept van drug/target interactie, dat teruggaat tot het begin van de moderne farmacologie. In **Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding het bewijs dat een op traditionele evenwichts bepalingen gebaseerde redenering (optimalisatie van geneesmiddel-affiniteit leidt tot een betere werkzaamheid en veiligheid) niet in staat is om de huidige hoge uitval in de vroege ontwikkelings fase van geneesmiddelen te voorkomen. In het afgelopen decennium heeft de bindingskinetiek van het geneesmiddel met het doelwit (met name de associatie- en dissociatiesnelheidsconstanten, en de verblijftijd) meer en meer aandacht gekregen, hetgeen een paradigma verschuiving is om parameters van effectiviteit en veiligheid van een geneesmiddel beter te voorspellen. We besloten om de bindingskinetiek van G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR) te onderzoeken, aangezien GPCR betrokken zijn bij verschillende belangrijke fysiologische en farmacologische functies, en het doelwit zijn van ongeveer 30% van alle geneesmiddelen op de markt. Zowel de menselijke cannabinoïde receptor 1 ( $hCB_1$ ) en de humane adenosine  $A_1$ - en  $A_3$  ( $hA_1$ - en  $hA_3$ )-receptoren werden gekozen als prototypes voor een GPCR en als potentiële doelen voor geneesmiddelen. Historische aspecten van de bindingskinetiek van geneesmiddel en receptor worden ook samengevat in **Hoofdstuk 1**.

In **Hoofdstuk 2** en **3** was onze studie van de kinetiek van de binding gericht op de menselijke cannabinoïde  $hCB_1$ -receptor, een van de 'belangrijkste actieve onderdelen' van het endocannabinoïdesysteem (ECS). In het specifieke geval van obesitas is de ECS, inclusief de  $hCB_1$ -receptor, overactief met verhoogde niveaus van endocannabinoïden in plasma en in centrale en perifere weefsels. Daarom is blokkade van de  $hCB_1$ -receptor een potentiële benadering voor de behandeling van obesitas. Rimonabant, een inverse agonist voor de  $hCB_1$ -receptor, is ontwikkeld door Sanofi-Aventis en op de Europese markt geïntroduceerd in 2006. Het werd echter snel uit de handel genomen vanwege het risico van onaanvaardbare psychische bijwerkingen. Hoewel onderzoekers veel tegenslagen hebben ondervonden de ontwikkeling van dit medicijn, zijn de intensieve inspanningen

voor het ontdekken van geneesmiddelen nooit gestopt. In **Hoofdstuk 2** hebben we naast een traditionele structuur-affiniteitsrelatie (SAR) -analyse ook een uitgebreide structuur-kinetische relatie (SKR) studie uitgevoerd, betreffende een reeks 1,2-diarylimidazol-4-carboxamidederivaten ontwikkeld als hCB<sub>1</sub>-receptorantagonisten. De verbindingen vertonen hoge affiniteiten en een diverse reeks kinetische profielen bij de hCB<sub>1</sub>-receptor. In **Hoofdstuk 3** werd een andere reeks 1-(4,5-diarylthiofeen-2-carbonyl)-4-fenylpiperidine-4-carboxamidederivaten en rimonabant als vergelijking geselecteerd voor SKR-analyse en verder moleculair farmacologisch onderzoek. Deze studie toont aan dat antagonisten voor de hCB<sub>1</sub>-receptor een zeer uiteenlopende kinetiek kunnen hebben (het verschil in verblijftijd in **Hoofdstuk 3** is 159-voudig, terwijl 18,5 in **Hoofdstuk 2**), die niet gecorreleerd zijn aan hun evenwichtsaffiniteiten. Bovendien lijken hun dissociatiesnelheden hun (in vitro) farmacologische effect te bepalen. Voor zowel **Hoofdstuk 2** als **Hoofdstuk 3**, gebaseerd op de recentelijk opgeloste kristalstructuren van de hCB<sub>1</sub>-receptor, stellen we voor dat de verschillen in dissociatie verklaard kunnen worden door een andere bindingswijze van antagonisten met lange verblijftijd in vergelijking met antagonisten met een korte verblijftijd (zoals rimonabant) waarin "ongunstige" watermoleculen worden verplaatst. We hebben geleerd dat, naast affiniteit, aanvullende kennis van bindingskinetiek nuttig is voor het selecteren van nieuwe antagonisten voor de hCB<sub>1</sub>-receptor in de vroege fasen van geneesmiddelontdekking voor de behandeling van obesitas.

Vervolgens hebben we bindingskinetiek onderzocht op de humane adenosine A<sub>3</sub> (hA<sub>3</sub>) receptor in **Hoofdstuk 4** en **5**. De hA<sub>3</sub>-receptor is gesuggereerd als een bruikbaar doelwit voor geneesmiddelen bij ontstekingsziekten en bij kanker. Tot nu toe is een aantal selectieve hA<sub>3</sub>-receptoragonisten (bijvoorbeeld IB-MECA en 2-Cl-IB-MECA) die ontstekingsremmende of antikanker effecten induceren, onder klinisch onderzoek. In **Hoofdstuk 4** gaan we dieper in op de eigenschappen van een reeks pyrido [2,1-f] purine-2,4-dion-derivaten als hA<sub>3</sub>-antagonisten. Veel verbindingen vertoonden hoge affiniteiten en een breed scala aan kinetische profielen. Van een  $k_{on}$ - $k_{off}$ - $K_D$ -kinetische kaart verdeelden we de antagonisten in drie subgroepen, die een mogelijke richting voor de verdere ontwikkeling van hA<sub>3</sub>R-antagonisten aangaven. Daarnaast hebben we een onderzoek met een computermodel

uitgevoerd dat licht werpt op de cruciale receptor interacties die de bindingskinetiek van de verbindingen veroorzaken. In **Hoofdstuk 5** is de bindings kinetiek van agonisten voor de hA<sub>3</sub>-receptoronderzocht. We hebben eerst een kinetische test voor agonisten gevalideerd. Vervolgens werden twee reeksen van ribofurano en methanocarba ([3.1.0] bicyclohexaan) adenosinederivaten beoordeeld op zowel affiniteit als kinetiek. Daarna werd een retrospectieve evaluatie besproken die verblijftijden en in vivo-werkzaamheid koppelt. Last but not least, van een  $k_{on}$ - $k_{off}$ - $K_D$  kinetische kaart verdeelden we de agonisten in drie subgroepen, wat een mogelijke route voor de verdere ontwikkeling van hA<sub>3</sub>R-agonisten biedt.

In **Hoofdstuk 6** wordt de toepassing van een nieuwe radio-isotopentechnologie in bindingskinetiek beschreven voor de humane adenosine A<sub>1</sub>-receptor. In vergelijking met de klassieke radioligand-bindings assay, kan vanwege de robuustheid en het potentieel voor high-throughput screening aan deze technologie de voorkeur worden gegeven voor verdere kinetische studies.

In het laatste **Hoofdstuk 7** bieden de onderzoeken van de bindingskinetiek, die in dit proefschrift worden beschreven, een beter en veelzijdig begrip van interacties tussen geneesmiddelen en doelen (receptoren), en worden toekomstige perspectieven geschetst. Hopelijk hebben alle bevindingen uit dit proefschrift nieuwe inzichten opgeleverd in het moleculaire aspect van de ligand-receptor bindingskinetiek, en zullen ze suggesties bieden voor het ontwerp van betere liganden met een geschikt kinetisch profiel, nieuwe technologieën voor snelle kinetische beoordeling en uiteindelijk geschikte evaluatieschema's voor een betere weg naar effectieve en veilige geneesmiddelen.