



Universiteit
Leiden
The Netherlands

To bind or not to bind, that is an important question! : Development of covalent probes for adenosine receptors

Yang, X.

Citation

Yang, X. (2019, December 4). *To bind or not to bind, that is an important question! : Development of covalent probes for adenosine receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/81190>

Version: 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/1887/81190>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/81190> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Yang, X.

Title: To bind or not to bind, that is an important question! : Development of covalent probes for adenosine receptors

Issue Date: 2019-12-04

Samenvatting

De meeste geneesmiddelen zijn op maat gemaakt om een reversibele interactie aan te gaan met hun biologische aangrijpingspunten, genaamd target eiwitten. Het vormen van eecovalente en irreversibele binding met een target eiwit kan mogelijk leiden tot nadelige gevolgen wat tot bedenkingen heeft geleid om covalente geneesmiddelen als een medicijnklasse te zien. Echter, gezamenlijke inspanningen en successen in het veld van medicijnontwikkeling om de sterkte van geneesmiddel-eiwitinteracties te maximaliseren, hebben het concept van "covalente interacties" nieuw leven ingeblazen. Covalente interacties kunnen de werkingsduur verlengen en de activiteit en selectiviteit verbeteren, wat voordelen biedt voor zowel chemische probes als kandidaat-geneesmiddelen. Mogelijke tekortkomingen van covalente werkingsmechanismen kunnen worden aangepast door verbindingen te ontwerpen die gecontroleerde activiteit vertonen en die uit te rusten met selectiviteit voor het target eiwit. Daarom wordt in dit proefschrift een covalente strategie toegepast die compatibel is met een target-gerichte, structuur-gestuurde ontdekkingsparadigma, met een focus op G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR's) als aangrijpingspunten voor geneesmiddelen.

Hoofdstuk 1 behandelt de belangrijkste concepten die in het proefschrift zijn bestudeerd. Het hoofdstuk begint met een inleiding over GPCR's, waarbij de focus ligt op de adenosine receptoren. Vervolgens worden de concepten van covalente liganden voor GPCR's en de huidige situatie en uitdagingen beschreven. **Hoofdstuk 2** gaat verder met het bespreken van de opkomst van moleculaire probes om de biologische effecten van adenosine receptoren in kaart te brengen en vat samen hoe probes worden gebruikt om adenosine receptorsubtypen zowel *in vitro* als *in vivo* te karakteriseren. Verder wordt de rol van deze receptoren in fysiologische en ziektecondities bestudeerd. De **hoofdstukken 3-6** beschrijven het ontwerpproces van covalente liganden voor adenosine receptoren en demonstreren het gebruik van deze liganden om farmacologische effecten te bewerkstelligen.

In **hoofdstuk 3** wordt LUF7445 geïntroduceerd en uitgebreid gekarakteriseerd. Deze covalente antagonist is ontworpen op basis van een niet-xanthine antagonist met hoge affiniteit, ZM241385. Deze moleculaire "mal" werd gecokristalliseerd met hA_{2A}R, wat een heldere blauwdruk van de ligand-binding interacties opleverde. Analyse van de vorm van de bindingsplaats toont aan dat de fenylethylamine-keten in ZM241385 is gericht op het meer aan oplosmiddel blootgestelde extracellulaire gebied (EL2 en EL3), waar ook veel ruimte is om de elektrofiele fluorosulfonyl groep te introduceren die verantwoordelijk is voor de

covalente interactie. Met behulp van tijdsafhankelijke affiniteitsverschuiving en kinetische competitie associatie experimenten, werd LUF7445 geïdentificeerd als een waarschijnlijk covalente antagonist, wat verder werd bevestigd met wash-out experimenten. Een docking model gebaseerd op de structuur van de adenosine A_{2A} receptor gecombineerd met plaatsgerichte mutagenesestudies suggereert een bindingsmodus van LUF7445 met als ankerpunt lysine-aminozuur K153^{ECL2}. Ondertussen werd een functioneel experiment, gecombineerd met wash-out experimenten, opgezet om de sterkte van de covalente binding van LUF7445 te onderzoeken. Deze bevindingen bevorderen studies van covalente liganden en dienen als een prototype voor een therapeutische benadering waarbij een covalente antagonist nodig kan zijn om langdurige en persistente aanwezigheid van het endogene ligand adenosine tegen te gaan.

Geïnspireerd door het succesvolle ontwerp van LUF7445, begint **hoofdstuk 4** met het op structuur gebaseerd ontwerpen van covalente antagonisten voor menselijke adenosine A₃-receptoren, waarvoor maar weinig structurele inzichten in de receptor-bindingsplaats zijn. Uitgaande van de 1H,3H-pyrido[2,1-*f*]purine-2,4-dion-antagonist basisstructuur werd een reeks liganden gesynthetiseerd die een fluorosulfonyl “warhead” met een variërende linker dragen. De gestroomlijnde follow-up workflow om deze liganden te karakteriseren werd overgenomen van **hoofdstuk 3**, en de bevindingen suggereren dat LUF7602 zich gedraagt als een covalente antagonist voor de menselijke adenosine A₃-receptor. Daarnaast werd in dit onderzoek een niet-reactief methylsulfonyl-derivaat LUF7714 ontwikkeld als een reversibel bindende controleverbinding. In combinatie met *in silico* hA₃R-homologiemodellering en plaatsgerichte mutagenese werd LUF7602 gebruikt om de ruimtelijke oriëntatie en topografie van de receptor-ligandbindingsplaats te karakteriseren, waarbij werd aangetoond dat aminozuurresidu Y265^{7,36} het unieke ankerpunt van de covalente interactie is. Uiteindelijk werd uit deze gestructureerde benadering snel een goed gedefinieerd covalent ligand verkregen en geprofileerd.

Notabene, deze onderzoekswerkstroom, inclusief rationeel ontwerp van covalente liganden en een niet-reactieve sulfonyl-dragende controleverbinding, alsmede de identificatie van covalente interactie gecombineerd met *in silico*-modellering en plaatsgerichte mutagenese, kan dienen als een gestroomlijnde aanpak om de structurele details over ligandherkenning voor andere GPCR's te bestuderen.

Vervolgens beschrijft **hoofdstuk 5** het ontwerp, de synthese en de toepassing van een op capadenoson gebaseerde covalente partiële agonist voor de adenosine A₁ receptor, LUF7746, die een elektrofiele fluorosulfonylgroep bevat. Tevens werd een niet-reactief ligand met een methylsulfonylgroep, LUF7747, ontworpen als controle ligand. Naast de eerder genoemde gestroomlijnde aanpak om covalente liganden te karakteriseren, werd een analyse van hA₁R-gemedieerde G-eiwit-activering gebruikt om LUF7746 als een partiële agonist te identificeren alsook de ongevoeligheid voor blokkering door een antagonist/inverse agonist. Een *in silico* structuur-gebaseerde docking-studie gecombineerd met plaatsgerichte mutagenese van de hA₁R toonde aan dat ook hier aminozuur Y271^{7,36} het primaire aangrijpingspunt was voor de covalente interactie. Uiteindelijk werd een label-vrij intacte-cel experiment opgezet om de morfologische celrespons te identificeren als gevolg van de onomkeerbare LUF7746-activering van de A₁-receptor.

Volgend op deze demonstraties van covalente liganden om de farmacologische effecten van adenosine receptoren te onderzoeken, beschrijft **hoofdstuk 6** de ontwikkeling van A_{2A}R covalente liganden tot een op affiniteit gebaseerde probe. Hier werd een covalent ligand, LUF7445, uitgerust met een terminale alkyngroep om te dienen als een op affiniteit gebaseerde probe, LUF7487. Na binding aan de gezuiverde hA_{2A}R werd deze probe gekoppeld aan de klikbare fluorofoor Cy3-azide en werd onomkeerbare en concentratieafhankelijke labelling aan gezuiverd hA_{2A}R gevisualiseerd met behulp van SDS-PAGE. Het labellen van het gezuiverde hA_{2A}R door LUF7487 kon worden geremd door zowel reversibele als irreversibele antagonisten, op voorwaarde dat ze zich richten op dezelfde receptor-bindingsplaats. Uiteindelijk werd een succesvolle labeling van de receptor in celmembranen die hA_{2A}R tot overexpressie brachten aangetoond, wat LUF7487 tot een veelbelovende op affiniteit gebaseerde probe maakt die hopelijk de basis vormt voor de verdere ontwikkeling van probes voor GPCR's.

Samenvattend is de benadering van ontwerp en farmacologisch karakteriseren van covalente liganden voor adenosine receptoren onderzocht en gedetailleerd in dit proefschrift. Een universele strategie voor het ontwerp van covalente liganden is onderzocht en de bevindingen benadrukken verschillende elementen die de covalente ligand-receptor interactie sterk kunnen beïnvloeden. Deze factoren vertonen een optimale combinatie afhankelijk van de affiniteit van de farmacofoor, de nabijheid van de chemisch reactieve groep ('warhead') tot een geschikt nucleofiel aminozuurresidu en de reactiviteit van de 'warhead'. De algemene conclusie van de resultaten beschreven in dit proefschrift en de komende mogelijkheden voor

de ontdekking van geneesmiddelen worden in **hoofdstuk 7** gedetailleerd besproken. Met andere woorden, de nieuwe inzichten, verkregen door dit proefschrift, geven mogelijk waardevolle informatie voor geneesmiddelenonderzoek gericht op de adenosine receptoren alsook op andere GPCR's.