



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The road to Insurmountability: Novel avenues to better target CC Chemokine Receptors

Ortiz Zacarías, N.V.

Citation

Ortiz Zacarías, N. V. (2019, December 4). *The road to Insurmountability: Novel avenues to better target CC Chemokine Receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/81379>

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/1887/81379>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/81379> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ortiz Zacarías, N.V.

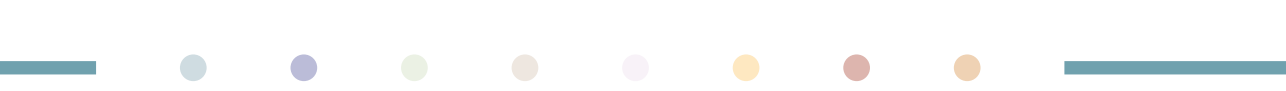
Title: The road to Insurmountability: Novel avenues to better target CC Chemokine Receptors

Issue Date: 2019-12-04

SAMENVATTING

Chemokine receptoren, waaronder CCR1, CCR2 en CCR5, zijn betrokken bij diverse ontstekings- en immuunziekten, zoals atherosclerose, reumatoïde artritis en kanker. Daarom zijn er talrijke pogingen gedaan om nieuwe geneesmiddelen voor deze receptoren te ontwikkelen. Toch heeft slechts één—maraviroc, gericht tegen CCR5—de markt bereikt, terwijl alle andere kandidaat-geneesmiddelen niet succesvol bleken in klinische onderzoeken, voornamelijk wegens een gebrek aan werkzaamheid. Het is van cruciaal belang om nieuwe hulpmiddelen en concepten te ontwikkelen waarmee we deze receptoren in de vroege ontwikkelingsfase van geneesmiddelen beter kunnen bestuderen en aangrijpen, om veiligere en effectievere geneesmiddelen te ontwikkelen. **Hoofdstuk 1** introduceert chemokine receptoren, en het chemokine systeem in het algemeen, als potentiële aangrijpingspunten voor geneesmiddelen, evenals de moeilijkheden die zich voordoen bij het onderzoeken van een dergelijk complex systeem. Daarnaast introduceert dit hoofdstuk de belangrijkste concepten die in dit proefschrift zijn bestudeerd, waaronder allosterische modulatie, '*insurmountability*', verblijfstijd op de receptor, polyfarmacologie en covalente remming.

Terwijl orthostere liganden binden op dezelfde bindingsplaats als de endogene liganden, binden allosterische liganden op een niet-overlappende, in de ruimte verschillende plaats. Alle allosterische liganden die in dit proefschrift worden beschreven, binden aan een zeer geconserveerde intracellulaire pocket, die (gedeeltelijk) overlapt met de bindingsplaats van intracellulaire signalerende effectoren, zoals G-eiwitten of β -arrestines. Dus wordt in **Hoofdstuk 2** het bewijs voor een dergelijke intracellulaire pocket onder chemokine receptoren en andere klasse A van G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs) beoordeeld. Bovendien worden de structurele kenmerken van deze bindingsplaats, de verschillende strategieën deze aan te grijpen en de potentiële voordelen van intracellulaire liganden besproken. Een van de eerste kristalstructuren die direct bewijs levert van een intracellulaire bindingsplaats is die van CCR2, beschreven in **Hoofdstuk 3**. We hebben de kristalstructuur van CCR2 opgelost in complex met twee antagonisten, BMS-681 en CCR2-RA-[R]. De structuur toonde aan dat BMS-681 bindt op de orthostere bindingsplaats, waar de endogene chemokines ook binden. Op deze manier inhibeert BMS-681 chemokine binding door rechtstreeks te concurreren om dezelfde bindingsplaats. CCR2-RA-[R] bindt zich aan een intracellulaire pocket die meer dan 30 Å verwijderd is van de orthostere plaats. Dus inhibeert CCR2-RA-[R] chemokine binding op een niet-competitieve, onoverkomelijke (*insurmountable*) manier, terwijl het direct de binding van signalerende effectoren verstoort. Gelijktijdige binding van beide liganden was niet alleen cruciaal om kristallisatie van CCR2 te bereiken, maar het resulteerde ook in een



zeer inactieve conformatie van deze receptor. Deze structuur biedt nieuwe inzichten over hoe CCR2 en chemokine receptoren in het algemeen beter kunnen worden aangegrepen.

Omdat deze intracellulaire bindingsplaats zeer geconserveerd is bij chemokine receptoren, werd deze gebruikt voor het ontwerp en de ontwikkeling van ‘poly-farmacologische’ liganden, d.w.z. liganden die meerdere receptoren remmen. Daarom wilden we in **Hoofdstuk 4** bepalen of CCR1 ook kan worden aangegrepen met intracellulaire antagonisten. Met behulp van [³H]-CCR2-RA-[R] als intracellulair hulpmiddel, vonden we dat dit ligand ook met hoge affiniteit bindt aan CCR1. We synthetiseerden ongeveer 40 verschillende CCR2-RA-[R] analogen, die verder werden gekarakteriseerd in zowel CCR1 als CCR2 om een structuur-activiteit relatie (SAR) analyse voor beide receptoren uit te voeren. Met deze strategie konden we liganden identificeren met een hogere selectiviteit voor CCR1 of CCR2, maar ook liganden met potentiële poly-farmacologische activiteit. Bovendien gedroegen deze intracellulaire liganden zich als inverse agonisten in CCR1, omdat ze de basale activiteit van deze receptor konden verminderen. Vanwege de hoge constitutieve activiteit van CCR1 is de ontwikkeling van inverse agonisten voor CCR1 zeer relevant. Naast CCR1/CCR2 liganden hebben we ons in **Hoofdstuk 5** gericht op de ontwikkeling van intracellulaire CCR2/CCR5 liganden. Hiervoor hebben we ons gericht op een triazolo-pyrimidinone structuur, die de beste activiteit in beide receptoren vertoonde in vergelijking met andere intracellulaire liganden. Vervolgens hebben we een SAR-studie uitgevoerd in beide receptoren door een reeks triazolo-pyrimidinone analogen te synthetiseren en te karakteriseren. Hoewel de meeste derivaten een veel hogere selectiviteit voor CCR2 vertoonden, vonden we ook enkele verbindingen met verbeterde activiteit voor CCR5 en dus verbeterde dubbele activiteit. Hun remmingsmechanisme werd ook onderzocht, wat het bewijs levert dat deze liganden onoverkomelijk antagonisme vertonen, omdat ze zelfs bij de hoogste concentratie van geteste agonisten tot een significante afname van receptoractiviteit leidden.

Hoofdstuk 6 richt zich op het ontwerp en de farmacologische karakterisering van het eerste intracellulaire covalente ligand voor CCR2. Op basis van de structuur van een bekend intracellulair ligand voor CCR2 hebben we een potentieel covalent ligand ontworpen met een reactieve thiocynaat groep. Om de covalente bindingsmodus te valideren, gebruikten we verscheidene radioligand-binding en functionele studies, die aantoonen dat, zelfs na uitgebreid wassen, dit ligand gebonden en functioneel blijft in CCR2. Verder hebben we *in silico* modellering uitgevoerd gevolgd door een mutagenesestudie om de aminozuren te identificeren die verantwoordelijk zijn voor een dergelijke covalente interactie. De resultaten van dit onderzoek wijzen op één cysteine residu als het belangrijkste interactiepunt, hoewel ook andere mogelijke secundaire interactiesites worden voorgesteld.

In **Hoofdstuk 7** hebben we onderzocht of een eerder gekarakteriseerde ‘lange verblijftijd’ orthostere CCR2 antagonist werkzaam was tegen atherosclerose. Hiervoor werden de

affiniteit en bindingskinetiek van deze antagonist gekarakteriseerd voor de muis-CCR2, terwijl de werkzaamheid ervan werd bepaald in een apolipoproteïne E-deficiënt muismodel van atherosclerose. Behandeling met de antagonist resulteerde in een significante vermindering van de rekrutering van monocytën en plaquegrootte bij zowel de halsslagader als de aortawortel. Bovendien toonden farmacokinetische gegevens en berekening van bezettingsgraden dat deze verbinding gedurende langere tijd volledige receptorbezetting bereikte. Ten slotte vat **Hoofdstuk 8** de belangrijkste conclusies en toekomstperspectieven samen die zijn afgeleid uit het onderzoek in dit proefschrift.