

Kemogenomik: Receptoren set fra lægemiddelstoffets synspunkt

I moderne lægemiddeludvikling screener man typisk store biblioteker med hundrede tusindvis af stoffer, og efter flere års søgen finder man et stof, der er egnet til klinisk afprøvning. En ny metode, kemogenomik, opdager hurtigt potentielle receptorligander. Her identificerer man kemiske grundstrukturer, som kan passe ind i bindingslommerne på mange forskellige receptorer.

Af Henrik Johansson, Tanja Bøgeløv Jørgensen, David E. Gloriam, Petrine Wellendorph, Lars D. Johansen, Daniel Sejer Pedersen og Hans Bräuner-Osborne

G-protein-koblede receptorer er placeret i cellemembraner, hvor de udgør omstillingsbordet mellem det ydre miljø i kroppen og cellernes indre.

G-proteiner aktiveres i et væld af situationer: Når øjet reagerer på lys, når smagen breder sig på tungen, når næsens duftceller indsnuser lugte, når tanker opstår i hjernens nerveceller, når hjertet slår, og når musklerne spændes eller slappes. Samtidig er G-proteiner involveret i mange sygdomme og dermed et centralt mål for udviklingen af nye lægemidler.

G-protein-koblede receptorer har alle en fælles tredimensionel opbygning, som består af syv alfahelixkæder, der tilsammen danner en bindingslomme i cellemembranen (figur 1).

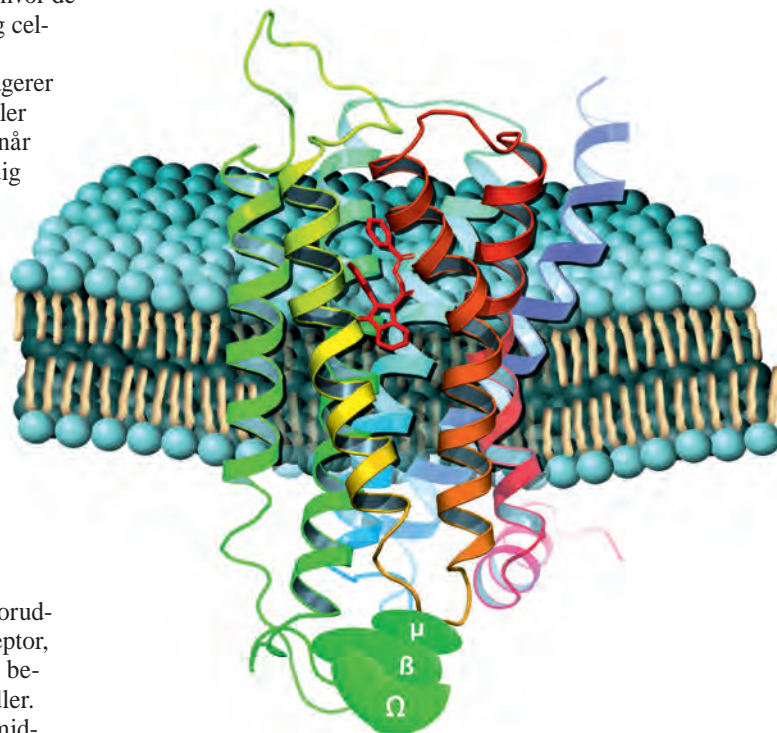
Identifikation af nye G-protein-koblede receptorer og afklaring af deres fysiologiske funktion vha. farmakologi, computerberegninger og medicinalkemi er et centralt forskningsområde for den molekylærfarmakologiske forskningsgruppe på Institut for Medicinalkemi, Københavns Universitet.

Farmakologi, bioinformatik eller kemogenomik?

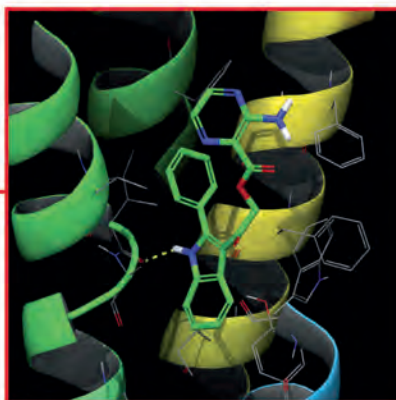
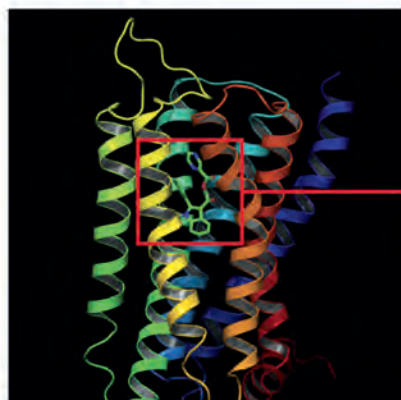
I jagten på nye lægemiddelstoffer forsøger forskere ofte at forudsige, hvilke kemiske stoffer der binder sig til netop den receptor, som de ønsker at påvirke, fordi receptoren er involveret i en bestemt sygdom og derfor er et potentielt mål for nye lægemidler. Normalt tager forudsigelserne udgangspunkt i kendte lægemiddelstoffer med virkning på beslægtede receptorer, hvilket sker ud fra en formodning om, at beslægtede receptorer binder beslægtede stoffer.

Imidlertid kan slægtskabet mellem receptorer defineres på flere forskellige måder, hvilket kan føre til meget forskellige resultater. F.eks. vil en farmakolog sige, at receptorer, der binder samme naturlige signalstof, er beslægtede, mens en bioinformatiker vil

vurdere slægtskabet mellem receptorer ud fra ligheder mellem receptorernes proteinstrukturer, som er genetisk bestemte og afstedkommet af den evolutionære udvikling. Desværre er ingen af de to tilgange særligt brugbare inden for medicinalkemi, fordi man normalt benytter syntetisk fremstillede stoffer frem for naturstof-

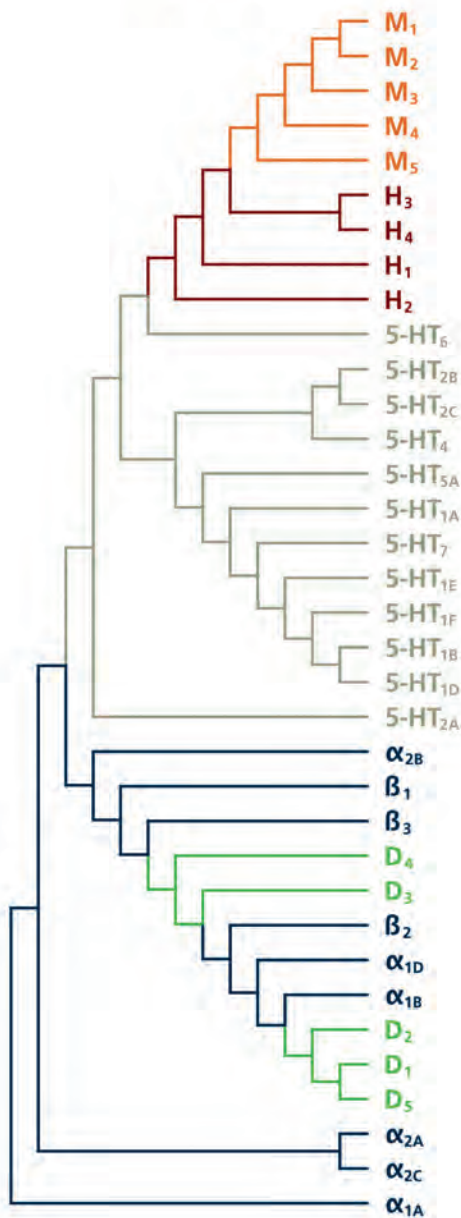
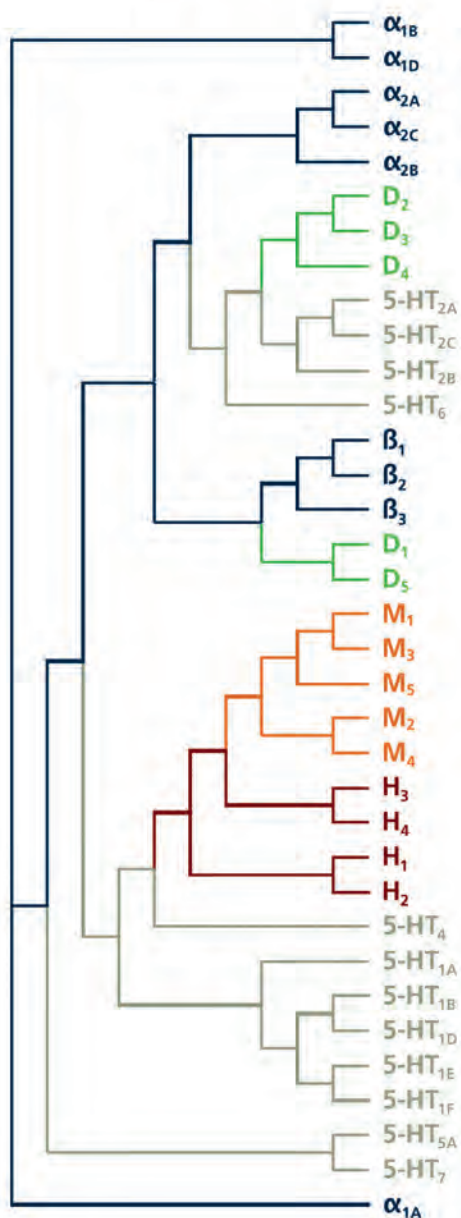


Figur 1. Figuren viser den tredimensionelle struktur af en G-protein-koblet receptor, som sidder i cellemembranen. Receptoren har syv transmembrane kæder, kaldet alfahelixer, som er vist med forskellige farver. Bindingslommen sidder en tredjedel nede i receptoren, hvori en 2-phenyl-indol-baseret ligand (rød farve) er indsat (antagonist **2**, figur 4). Når en ligand binder til lommen, aktiveres et G-protein på indersiden af membranen.



Bioinformatisk evolutionært slægtskab

Kemogenomisk bindingslomme-slægtskab



Figur 2. Slægtskab mellem receptorer kan analyseres bioinformatisk (tv.) og kemogenomisk (th). Ved en bioinformatisk analyse sammenlignes hele aminosyresekvensen i receptorproteinerne, mens man ved kemogenomisk analyse kun sammenligner sekvensen af de aminosyrer, som danner bindingslommen, hvortil et potentielt lægemiddelstof skal binde. Disse analyser fører til forskellige fylogenetiske træer, som ud fra hvert sit udgangspunkt beskriver, hvilke undertyper af en receptorfamilie, der er tættest beslægtet; jo kortere forgreninger, jo tættere slægtskab. I begge træer vises analyser af en række G-protein-koblede receptorer, der binder signalstofferne adrenalin (blå), dopamin (grøn), serotonin (grå), acetylcholin (orange) og histamin (rød).

fer. Metoderne er især uegnede, når det gælder stoffer, der binder til andre steder i receptoren end de naturligt forekommende signalstoffer.

En ny metode, kemogenomik, kan med succes bruges på syntetiske stoffer. Her kombinerer man de kemiske strukturer af farmakologisk aktive stoffer med genomiske data; typisk receptorproteineres aminosyresekvenser. Kemogenomik adskiller sig fra bioinformatik ved specifikt at fokusere på den del af receptoren, som binder til stofferne – bindingslommen – frem for hele receptoren (figur 2).

På den måde ser vi receptoren ud fra lægemiddelstoffets synspunkt, og det giver mere præcise forudsigelser af, hvilke type stoffer som binder til hvilke receptorer. Det er særlig relevant for genetisk fjernt beslægtede receptorer, fordi kemogenomik er den eneste fremgangsmåde, der kan forklare og forudsige, hvorfor nogle stoffer binder til mange typer receptorer, som ikke umiddelbart er beslægtede.

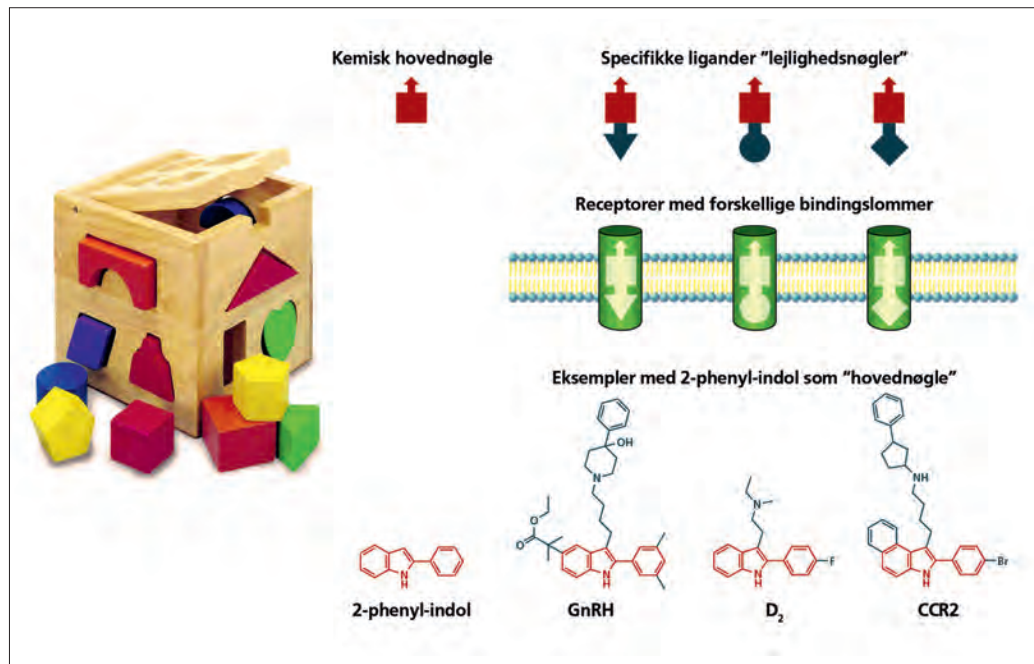
Kemiske hovednøgler

Moderne lægemiddeludvikling starter ofte med, at forskere tester titusinder af tilfældigt udvalgte kemiske stoffer. Ofte tager det flere år, før man finder ▶

MEDICINALKEMI

Figur 3. En kemisk hovednøgle har en grundstruktur (rød), som går igen i forskellige stoffer, der binder til forskellige receptorer.

De kemiske modifikationer (blå) gør stofferne til specifikke lejlighedsnøgler, som hver især kun passer til en bestemt bindingslomme. Nederst er hovednøglen 2-phenyl-indol vist sammen med tre lejlighedsnøgler, som binder specifikt til tre forskellige receptorer: Gonadotropin releasing hormone-receptoren (GnRH), D₂ dopamin receptoren og chemokin CCR2-receptoren.



et stof med reelt potentiale til klinisk afprøvning. Kemogenomiske forudsigelser kan bruges til at speede processen op ved at indsnævre stofbibliotekerne til en størrelse på få hundrede stoffer, som har langt større chance for at være aktive end de tilfældigt udvalgte molekyler i store stofbiblioteker.

Det gælder især for biblioteker baseret på små kemiske molekyler, som er kendt for at binde til mange forskellige receptorer, en slags kemiske hovednøgler. Her anvendes kemogenomik allerede med stor succes. Traditionelt er kemiske hovednøgler blevet testet mere eller mindre tilfældigt på forskellige receptorer, uden at man på forhånd havde en klar formodning om, at de ville kunne binde til den givne målreceptor. Med kemogenomik er vejen banet for at målrette udvælgelsen af kandidatstoffer og på den måde skyde genvej i lægemiddeludviklingen.

Mønstre i receptorerers bindingslommer

Kemogenomik er baseret på den hypotese, at receptorer, der binder de samme hovednøgler, har beslægtede bindingslommer mht. kemiske egenskaber som form, ladning og vandopløselighed. For familier af receptorer, der har den samme overordnede tredimensionelle struktur, er det muligt direkte at sammenligne de amino-

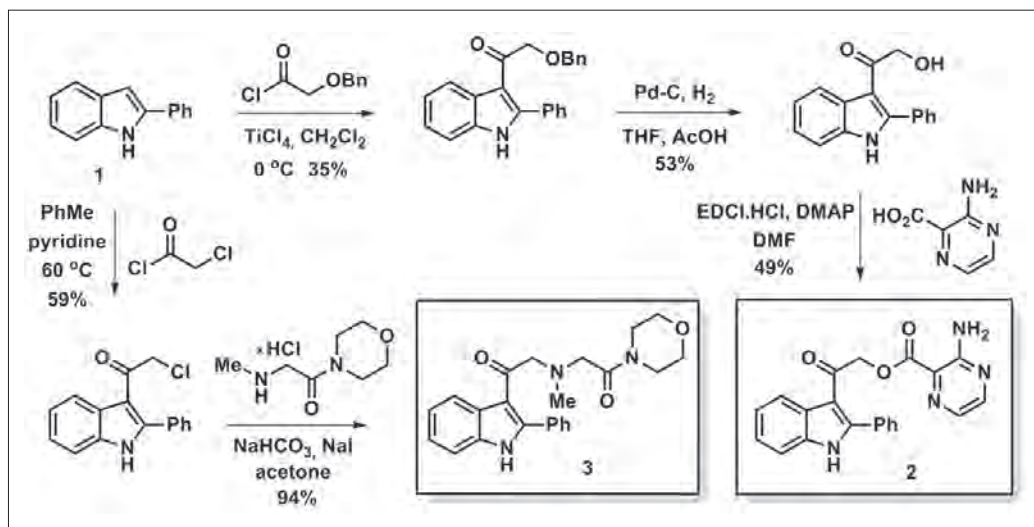
syrer, der danner bindingslommen i de forskellige undertyper, som binder de samme kemiske hovednøgler (figur 3).

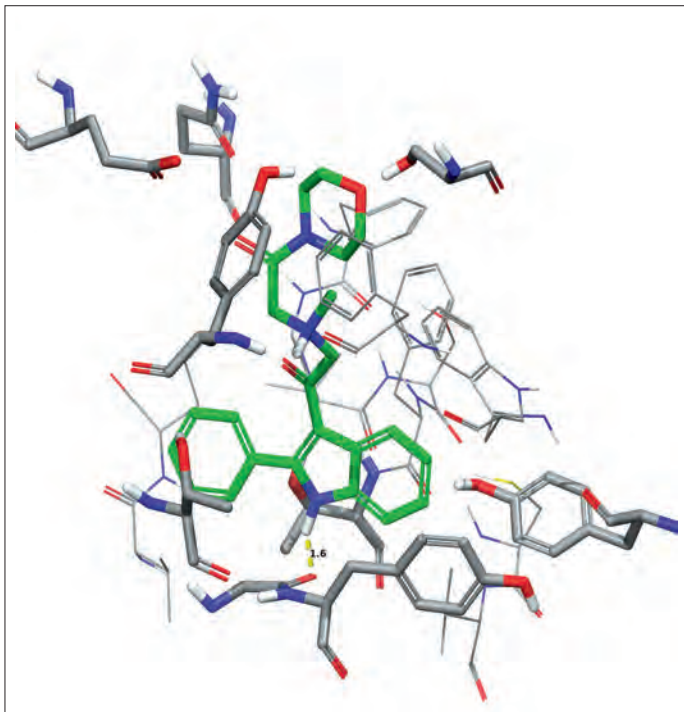
Ud fra denne viden kan forskere identificere aminosyremønstre, som er ansvarlige for binding af de forskellige dele af en kemisk hovednøgle. Et eksempel er G-protein-koblede receptorer, som tilhører en klasse af proteiner, der er mål for langt de fleste kendte lægemidler.

Ved at sammenholde layoutet for bindingslommerne for hver af de mange G-protein-koblede receptorer med hvilke kemiske hovednøgler, der kan binde til hvilke receptorer, opnår man efterhånden et billede af, hvilket layout der fører til binding af hvilke typer stoffer.

Når forskere står med en ny receptor, kan man nu se på de aminosyrer, som danner bindingslommen, og forudsige hvilken type kemiske hovednøgler, der passer i lommen. De kemiske hovednøgler har en fælles grundstruktur, som genkendes af mange receptorer, men ved at tilføje sidekæder med variabel struktur kan man ofte ændre stofferne til selektivt at passe i netop den målreceptor, som man vil påvirke med et lægemiddelstof (figur 3). Ved kemisk modifikation kan man med andre ord lave hovednøglerne om til lejlighedsnøgler, som kun påvirker den ønskede receptor. Sådanne

Figur 4. Syntesen af antagonistene **2** og **3** blev udført fra kommercielt tilgængeligt 2-phenylindol **1**. Begge synteser er baseret på Friedel-Crafts-lignende acyleringer i 3-positionen af 2-phenylindol, hvorefter de nødvendige sidekæder sættes på ved hhv. esterificering og alkylering. Eftersom antagonist **2** indeholder en labil esterfunktionalitet som let hydrolyseres *in vivo* blev stof **3** valgt som det primære udgangspunkt for udviklingen af en mere potent ligand. Endvidere har ligand **3** en langt bedre vandopløselighed sammenlignet med ligand **2**.





Figur 5. Interaktion mellem 3-substituerede 2-phenylindoler og GPRC6A-receptoren her vist for antagonist **3**. Indol-N-H-funktionaliteten hydrogenbinder til en carbonylgruppe i receptorens backbone (vist med en stiple, gul linje).

specifikke lægemiddelstoffer er fordelagtige, fordi de som regel medfører færre bivirkninger end uspecifikke stoffer.

Kemogenomik i praksis

For syv år siden identificerede vi en ny G-protein-koblet receptor, kaldet GPRC6A. Receptorens funktion er stadig ukendt, og for at afkode funktionen er det nødvendigt at udvikle stoffer, der selektivt kan aktivere eller deaktivere receptoren. Ved at sammenholde aminosyresekvensmønstrene i bindingslommen for GPRC6A med kendte kemiske hovednøgler, fandt vi en match i form af den kemisk struktur 2-phenyl-indol (**1**, figur 4).

På basis af den kemogenomiske forudsigtelse købte vi et mindre bibliotek med 32 stoffer, alle med det fælles 2-phenyl-indol-grundskelet, men med forskellige substituenten i 3-positionen. Stofbiblioteket blev testet på vores receptor GPRC6A, og på syv andre receptorer, som også binder 2-phenyl-indol-hovednøglen. På den måde

fandt vi tre stoffer, der alle har god selektivitet på vor receptor, ift. de beslægtede receptorer pga. forskelle i substituenterne. Stofferne **2** og **3** blev fundet farmakologisk interessante og er nu genstand for vores fortsatte forskning med afklaring af GPRC6As fysiologiske funktion (figur 4).

De to identificerede ligander **2** og **3** hæmmer GPRC6A-receptorens funktion (*i.e.* antagonist), og er de første kendte stoffer med god selektivitet for GPRC6A-receptoren. Stofferne er derfor potentielt vigtige modelstoffer, som kan benyttes til at undersøge receptorens funktion ved at hæmme/deaktivere receptoren og dermed fastslå dens funktion og vurdere dens potentiale som mål for udviklingen af nye lægemidler.

Antagonisterne **2** og **3** er et godt udgangspunkt for udviklingen af farmakologiske værktøjer til at afkode receptorens funktion, men stoffernes egenskaber er ikke gode nok til *in vivo*-studier. Ønskede egenskaber ved udvikling af ligander til *in vitro*- og i særdeleshed *in vivo*-studier er høj affinitet og selektivitet for målreceptoren, god vandopløselighed samt kemisk og metabolisk stabilitet.

Struktur-aktivitets-sammenhænge (SAR)

Efter identificering af antagonisten **3** skulle arbejdet med optimering af molekylets egenskaber påbegyndes. Gennem computerberegninger blev essentielle bindingsinteraktioner mellem receptoren og 2-phenyl-indolerne forudsagt.

Computerberegninger indikerede, at den væsentligste bindingsinteraktion var hydrogenbindingen mellem indolens NH-funktionalitet og en carbonylgruppe i GPRC6A-receptorens protein backbone (figur 5). Denne antagelse blev bekræftet ved at introducere en methylgruppe på indol-nitrogenet, hvilket resulterede i at stoffet

Må vi byde på en kop værdifuld kaffe?

Vi har i næsten 100 år handlet med gas til mange brancher og formål. Lad os byde på kaffe og fortælle dig mere om, hvordan vi kan skabe værdi for din virksomhed. Kontakt os på telefon 701 02 107.

STRANDMØLLEN

Strandmøllen A/S • Strandvejen 895 • 2930 Klampenborg • Tlf. 701 02 107 • strandmollen.dk

Intelligent Purification

Gilson Trilution LC-MS Purification
 Gilson PLC2020 Personal LC
 Genevac Rocket Evaporator

GILSON®

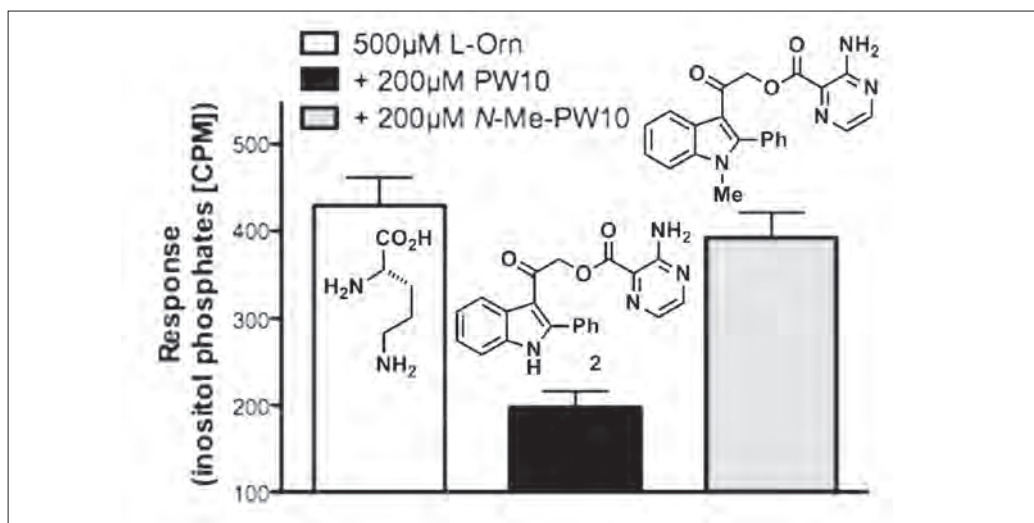
Genevac **SP SCIENTIFIC**
Intelligently Doing The Impossible

BIO LAB

Biolab A/S · Sindalsvej 29 · DK-8240 Risskov · Telefon 8621 2866 · Telefax 8621 2301 · E-mail: sales@biolab.dk

MEDICINALKEMI

Figur 6. En vigtig identificeret struktur-aktivitets-sammenhæng (SAR) er indolens NH-gruppe, hvis hydrogenatom hydrogenbinder med en carbonylgruppe i receptorens aminosyresekvens. Introduktion af en methylgruppe på indol-nitrogenet i ligand **2** resulterer i at molekylet mister sin antagonistiske effekt. Resultatet blev sammenholdt med den naturlige agonist L-ornithin alene og i kombination med antagonist **2** samt den N-methylerede analog af antagonist **2**.



i fuld overensstemmelse med computerberegningerne mistede sin antagonistiske effekt (figur 6).

Ligeledes har computerberegninger indikeret, at phenylgruppen i 2-positionen på indol-ringen bidrager med vigtige bindingsinteraktioner. Ved at fjerne phenylringen eller variere substituentsmønstret på phenylringen forsøger vi nu at fastlægge dennes betydning. Desuden undersøger vi, hvilken effekt andre variationer af ligand **3** har på ligandens farmakologiske egenskaber *in vivo* og *in vitro* (figur 7).

Gennembrud for kemogenomisk forskning

Resultatet af vores forskning er et gennembrud for det kemogenomiske forskningsområde, fordi man ikke tidligere har kunnet finde kemiske hovednøgler, som kan anvendes på den gruppe af receptorer, GPRC6A tilhører. Det skyldes, at GPRC6A er meget fjernt beslægtet med de receptorer, som 2-phenyl-indol normalt binder til. Hvis vi havde benyttet de klassiske farmakologiske eller bioinformatiske metoder, havde vi aldrig opdaget, at GPRC6A-receptoren kan hæmmes af 2-phenyl-indol-stoffer.

Kemogenomik udmærker sig således ved at være meget tidsbesparende, fordi de nye stoffer blev fundet på kort tid ved blot at teste nogle få dusin stoffer. Det illustrerer tydeligt, hvor effektivt det kemogenomiske koncept er inden for moderne medicinal kemi.

Videre læsning

Denne artikel, som beskriver den molekylær-farmakologiske forskningsgruppes kemogenomiske forskning, er beskrevet i detaljer i følgende artikel: Proof of concept for inter-GPCR-family ligand inference: Chemogenomic discovery of the first selective alloste-

ric antagonists at the GPRC6A receptor, D.E. Gloriam, P. Wellendorph, L.D. Johansen, A.R.B. Thomsen, D. Sejer Pedersen, H. Bräuner-Osborne, *In press*, Chemistry & Biology.

Ph.d.-studerende Henrik Johansson på Institut for Medicinal kemi.
 Skolarstuderende Tanja Bøgeløv Jørgensen på Institut for Medicinal kemi.
 Ph.d. David E. Gloriam er lektor på Institut for Medicinal kemi.
 Ph.d. Petrine Wellendorph er lektor på Institut for Medicinal kemi.
 Ph.d. Lars D. Johansen er forsker på ChemoMetec A/S.
 Ph.d. Daniel Sejer Pedersen er lektor på Institut for Medicinal kemi.
 Dr. pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor på Institut for Medicinal kemi.

E-mail-adresser

David E. Gloriam: computer modelling, dg@farma.ku.dk
 Hans Bräuner-Osborne: molekylær farmakologi, hbo@farma.ku.dk
 Daniel Sejer Pedersen: medicinal kemi, dsp@farma.ku.dk

Artiklen er baseret på en tidligere artikel fra Lægemedelforskning 2010 fra Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Figur 7. Substituent og funktionelle grupper på stof **3** varieres for at få indsigt i struktur-aktivitets-forhold (SAR). Resultatet fra SAR-studierne benyttes efterfølgende til at designe og syntetisere mere potente, stabile og selektive GPRC6A-antagonister.

