

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/65384> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Doornbos, M.L.J.

**Title:** Towards improved drug action : target binding kinetics and functional efficacy at the mGlu2 receptor

**Issue Date:** 2018-09-12



## SAMENVATTING VOOR LEKEN

Iedereen maakt in zijn leven gebruik van geneesmiddelen. Door het grote aantal geneesmiddelen vandaag de dag, is het moeilijk voor te stellen dat er een tijd was waarin maar enkele medicijnen beschikbaar waren. Toch was het aantal geneesmiddelen honderd jaar geleden, in het begin van de twintigste eeuw, zeer beperkt en waren aandoeningen die tegenwoordig relatief eenvoudig met geneesmiddelen te genezen zijn toen moeilijker te behandelen en soms zelfs levensbedreigend. Sindsdien is het aantal beschikbare geneesmiddelen enorm toegenomen. Geneesmiddelenontwikkeling zoals we die vandaag de dag kennen komt voort uit de gigantische toename van kennis van de processen in het menselijk lichaam die betrokken zijn bij ziekten en daarnaast door de sterk toegenomen mogelijkheden om een grote diversiteit aan moleculen te synthetiseren. Deze samenvatting beschrijft eerst het proces van geneesmiddelenontwikkeling. Vervolgens wordt aangegeven waar in het proces van geneesmiddelenontwikkeling de resultaten uit dit proefschrift bijdragen aan de ontwikkeling van toekomstige medicijnen. Tenslotte wordt dit hoofdstuk afgesloten met een samenvatting van de resultaten uit dit proefschrift.

Het proces van geneesmiddelenontwikkeling kan worden onderverdeeld in verschillende fasen (Figuur 1). De ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel start met de onderzoeksfase waarin allereerst het begrijpen van de ziekte waarvoor de therapie bedoeld is centraal staat. Wanneer de ziekte voldoende op moleculair niveau begrepen is en er een aangrijpingspunt voor een geneesmiddel is geïdentificeerd kan met het ontwerpen van een potentieel geneesmiddel begonnen worden. In deze fase wordt een groot aantal moleculen (kandidaat-geneesmiddelen) gesynthetiseerd. Dit aantal kan oplopen tot 10.000. Al deze moleculen worden vervolgens getest op hun werkzaamheid en affiniteit voor het aangrijpingspunt. Voor deze experimenten worden celkweekmodellen gebruikt, zogeheten *in vitro* experimenten. Op basis van de resultaten van deze experimenten wordt vervolgens een selectie gemaakt van moleculen die veelbelovend zijn en daarom doorgaan naar de volgende fase.

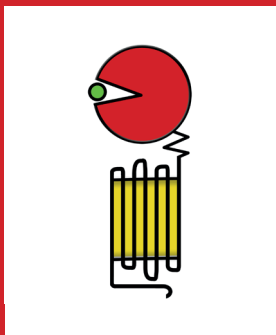
## Het proces van geneesmiddelenontwikkeling



**Figuur 1.** Overzicht van de verschillende fasen van het proces van geneesmiddelenontwikkeling. De rode pijlen geven een vertaalstap weer, waarbij op basis van behaalde resultaten een selectie van veelbelovende kandidaat-geneesmiddelen wordt gemaakt die in de volgende fase verder getest wordt. Pictogrammen zijn van *thenounproject.com*. Het figuur is gebaseerd op *vib.be/nl/mens-en-gezondheid/Pages/De-ontwikkeling-van-een-geneesmiddel.Het-proces-van-geneesmiddelenontwikkeling*

In deze preklinische ontwikkelingsfase wordt de werkzaamheid en de veiligheid van de kandidaat-geneesmiddelen verder getest met *in vitro* experimenten. Daarnaast wordt er getest in proefdiermodellen, de zogeheten *in vivo* experimenten. Aan de hand van de behaalde resultaten kan dan bepaald worden of de kandidaat-geneesmiddelen voldoende werkzaam en veilig zijn om geselecteerd te worden voor klinische experimenten.

De klinische experimenten zijn onderverdeeld in drie fasen. Er wordt begonnen met studies in gezonde vrijwilligers (fase 1), gevolgd door studies bij kleine groepen patiënten (fase 2) en een grote groep patiënten (fase 3). Hierbij zijn vooral de veiligheid en de werkzaamheid van het geneesmiddel van belang. Daarnaast wordt er gekeken hoe het geneesmiddel zich in het lichaam gedraagt (opname, verdeling, afbraak, uitscheiding).



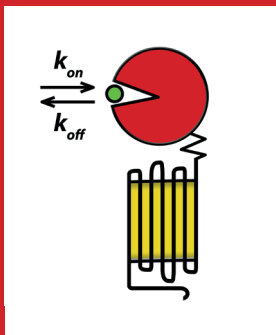
### Box 1. G-eiwitgekoppelde receptoren

Een veelgebruikte groep van aangrijpingspunten van geneesmiddelen zijn G-eiwitgekoppelde receptoren (GPCRs). Dit zijn eiwitten die zich in de celwanden bevinden en overal in ons lichaam te vinden zijn. Deze receptoren zijn betrokken bij de signaaloverdracht in ons lichaam en zijn het aangrijpingspunt van meer dan 30% van de beschikbare medicijnen. Veel van deze medicijnen kennen we allemaal, bijvoorbeeld bètablokkers tegen een hoge bloeddruk en antihistaminica tegen hooikoorts. Moleculen die aan deze receptoren binden kunnen grofweg worden onderverdeeld in twee groepen. Agonisten die de receptor activeren (lichaamseigen zoals adrenaline, of geneesmiddelen zoals ventolin tegen astma) en antagonist die de werking van lichaamseigen processen verminderen (bijvoorbeeld cafeïne, of geneesmiddelen zoals metoprolol en andere bèta-blokkers).

Op het moment dat al deze verschillende fasen succesvol doorlopen zijn kan er een uitgebreid dossier worden ingediend bij de autoriteiten om toestemming te krijgen om het nieuwe geneesmiddel op de markt te mogen brengen. Wanneer het medicijn op de markt is wordt het nog gevolgd: de bijwerkingen en eventuele andere interacties worden constant in de gaten gehouden.

### Waar in het proces van geneesmiddelenontwikkeling dragen de resultaten in dit proefschrift bij?

Tijdens het proces van geneesmiddelenontwikkeling wordt op meerdere momenten een selectie gemaakt op basis van de beschikbare resultaten, zogeheten vertaaltappen (aangegeven met rode pijlen in figuur 1). Tijdens de onderzoeksfase worden alle 10.000 nieuw gemaakte stoffen getest in celkweekmodellen. Op basis van de beschikbare resultaten uit de celkweekmodellen wordt een selectie gemaakt van stoffen die worden getest in de preklinische fase, dit gaat vaak om ongeveer 100 stoffen, nog maar 1% van de 10.000 dus. Van deze 100 stoffen blijken er gemiddeld uiteindelijk maar ongeveer 10 veilig en werkzaam. 90 van de 100 stoffen worden dus wel getest, maar blijken niet goed genoeg te zijn. Dit laat zien dat de voorspellende waarde van de celkweekmodellen die in de onderzoeksfase gebruikt worden lang niet zo goed is als we zouden wensen, maar 10% van de geselecteerde stoffen blijkt veilig en werkzaam. Dit leidt tot het onnodig uitvoeren van heel veel experimenten, waaronder veel *in vivo* experimenten met proefdieren. De resultaten die in dit proefschrift beschreven worden dragen bij aan het beter begrijpen van wat er nodig is om een betere selectie te maken in de onderzoeksfase en zo het preklinisch onderzoek te verbeteren en het gebruik van proefdieren te verminderen. Hiervoor is gebruik gemaakt van een aangrijpingspunt voor potentiële nieuwe geneesmiddelen, de metabotrope glutamaat-receptor 2 (mGlu<sub>2</sub>). Deze receptor (Box 1) is op moleculair niveau onderzocht en daarnaast zijn er extra experimenten ontwikkeld om de voorspellende waarde van *in vitro* experimenten te vergroten. Uiteindelijk wordt op deze manier een bijdrage geleverd aan het verbeteren van het proces van geneesmiddelenontwikkeling.



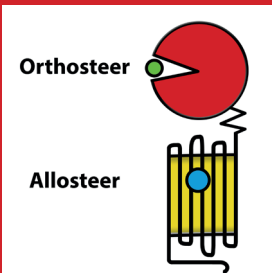
#### Box 2. Bindingskinetiek

Kinetiek of kinetica is de leer van bewegingskrachten en snelheden. In de farmacologie wordt kinetiek gebruikt om de snelheid van bepaalde processen te beschrijven. Wanneer we spreken over bindingskinetiek gaat het over de snelheid waarmee een molecuul bindt aan zijn aangrijpingspunt. In de context van het onderzoek beschreven in dit proefschrift gaat het dan over de snelheid waarmee een molecuul bindt aan de receptor (beschreven door de associatiesnelheidsconstante  $k_{on}$ ) en de snelheid waarmee het molecuul loslaat van de receptor (beschreven door de dissociatiesnelheidsconstante  $k_{off}$ ). Aan de hand van de  $k_{off}$  kan dan de verblijftijd (residence time (RT) in het Engels) van een molecuul bepaald worden. Deze verblijftijd geeft een indicatie voor de duur van de binding van het molecuul aan de receptor.

## Samenvatting van het proefschrift

In het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift is gebruik gemaakt van de metabotrope glutamaat-receptor 2 (mGlu<sub>2</sub> receptor) als modelreceptor. Glutamaat is een signaalstof in onze hersenen en is de lichaamseigen activator (agonist) van deze receptor. Bij verschillende ziekten van het centrale zenuwstelsel zoals schizofrenie en depressie is de signalering van glutamaat verstoord. Omdat de mGlu<sub>2</sub> receptor de afgifte van glutamaat reguleert, wordt deze receptor gezien als aangrijpingspunt voor toekomstige medicijnen. Het doel van dit proefschrift is het werkingsmechanisme van de mGlu<sub>2</sub> receptor beter te begrijpen en om te evalueren of het toevoegen van kinetische *in vitro* experimenten (Box 2) zorgt voor een betere voorspelling van het uiteindelijke effect van potentiële medicijnen *in vivo*.

**Hoofdstuk 1** geeft een introductie op de verschillende concepten die in dit proefschrift worden behandeld. De belangrijkste van deze concepten zijn hier beschreven in Box 1-3. In **hoofdstuk 2** is het mechanisme van allosterische modulatie van de mGlu<sub>2</sub> receptor onderzocht. **Hoofdstuk 3** beschrijft het opzetten van de eerste methode om kinetiek (Box 2) van orthostere moleculen voor de mGlu<sub>2</sub> receptor te bepalen. Daarnaast werd bekeken hoe allosterische modulatoren de kinetiek van orthostere moleculen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** is een grote groep van 41 nieuwe positieve allosterische modulatoren voor de mGlu<sub>2</sub> receptor bestudeerd. Naast de klassieke parameters van affiniteit (hoe goed bindt een molecuul) en potentie (hoe werkzaam is het molecuul) werd hier ook gekeken naar de bindingskinetiek. Het bleek dat stoffen met een lange verblijftijd op de receptor een betere werkzaamheid lieten zien *in vivo*. Wanneer nu opnieuw een selectie gemaakt zou worden voor de *in vivo* te testen moleculen zou er mogelijk een andere en misschien betere selectie zijn gemaakt. **Hoofdstuk 5** beschrijft het ontwerp, synthese en karakterisering van een positieve allosterische modulator die covalent aan de mGlu<sub>2</sub> receptor bindt. Dit wil zeggen dat dit molecuul vast 'klikt' aan de receptor en niet meer loslaat. Een dergelijk molecuul is waardevol bij het bestuderen van de receptor en in het bijzonder van de bindingsplaats in de receptor. In **hoofdstuk 6** wordt een nieuwe methode beschreven die gebruikt kan worden om de mGlu<sub>2</sub> receptor te bestuderen. De conclusies uit de verschillende hoofdstukken zijn beschreven in **hoofdstuk 7**.



### Box 3. Allosterische modulatie

Moleculen binden op een vaste plaats op de receptor. Lichaamseigen moleculen binden op de zogeheten orthostere bindingsplaats. In de afgelopen decennia is gebleken dat veel receptoren daarnaast nog een tweede bindingsplaats hebben. Deze wordt omschreven als allosterische bindingsplaats. Moleculen die op deze plaats aan de receptor binden worden allosterische modulatoren genoemd. Deze moleculen hebben over het algemeen weinig effect op zichzelf (ze activeren of remmen de receptor niet of weinig in afwezigheid van een orthostere agonist), maar kunnen het effect van lichaamseigen moleculen versterken (positieve allosterische modulatoren (PAMs)) of juist afremmen (negatieve allosterische modulatoren (NAMs)).