



## Computeren viser vejen til et nyt potentielt lægemiddel

Harpsøe, Kasper; Kaae, Birgitte Høiriis; Balle, Thomas; Pickering, Darryl S; Kastrup, Jette Sandholm Jensen

*Published in:*  
Lægemiddelforskning

*Publication date:*  
2008

*Document version*  
Også kaldet Forlagets PDF

*Citation for published version (APA):*  
Harpsøe, K., Kaae, B. H., Balle, T., Pickering, D. S., & Kastrup, J. S. J. (2008). Computeren viser vejen til et nyt potentielt lægemiddel. *Lægemiddelforskning*, 28-30.

# Computeren viser vejen til et nyt potentielt lægemiddel

**Mange receptorer i kroppen indeholder flere identiske bindingssteder for lægemiddelstoffer. Ved at sammenkoble to molekyler af et lægemiddelstof kan to bindingssteder påvirkes i ét hug. Det styrker bindingen til receptoren, og virkningen forøges.**

Af Kasper Harpsøe, Birgitte H. Kaae, Thomas Balle, Darryl S. Pickering og Jette S. Kastrup

Når et lægemiddelstof binder til en receptor, frigives der en mængde energi, som kaldes bindingsaffinitet. Da bindingen til receptoren er en forudsætning for stoffets virkning, betyder en højere bindingsaffinitet normalt et mere effektivt lægemiddel.

Mange receptorer i kroppen er sammensat af flere ens enheder, som samtidig skal binde et lægemiddelmolekyle for at opnå optimal effekt. Det kræver altså, at fx to lægemiddelmolekyler uafhængigt af hinanden skal finde frem til to forskellige bindingssteder. I nogle tilfælde kan to ens lægemiddelmolekyler forbindes til ét molekyle, en dimer, der samtidig kan binde til de to bindingssteder. Det er lettere for et molekyle at finde frem til det rette bindingssted, end det er for to

molekyler at finde frem til to bindingssteder på samme tid. Derfor kan man forøge bindingsaffiniteten af en dimer op til tusind gange i forhold til monomeren.

En sådan forøgelse af bindingsaffiniteten kan give mere potente lægemidler, og fremstilling af dimere benyttes derfor i forsøget på at udvikle bedre medicin. På trods af flere eksempler på denne strategi er det dog først nu lykkedes at føre et strukturelt bevis for, at den øgede bindingsaffinitet og forbedrede virkning rent faktisk skyldes binding til to identiske bindingssteder. Vi genererede en hypotese ved hjælp af computersimuleringer og har siden bevist hypotesen via en røntgenstruktur og forsøg med cellekulturer.

## AMPA-receptorer

AMPA-receptorerne er en familie af receptorer, som er mål for lægemidler. Receptorerne er bl.a. involveret i hukommelse og indlæring, og ved sygdomme som Alzheimers sygdom ses et nedsat antal AMPA-receptorer i hjernen. Hvis impulserne fra de tilbageværende receptorer kan forøges, kan symptomerne måske afhjælpes.

AMPA-receptorer er ionkanaler og består af fire næsten identiske enheder, som hver indeholder et bindingssted for glutamat, som er et af hjernens vigtigste aktiverende signalstoffer. Receptorerne sidder i nervecellernes membraner og er ansvarlige for en stor del af impulsoverførslen mellem de enkelte celler i nervesystemet.

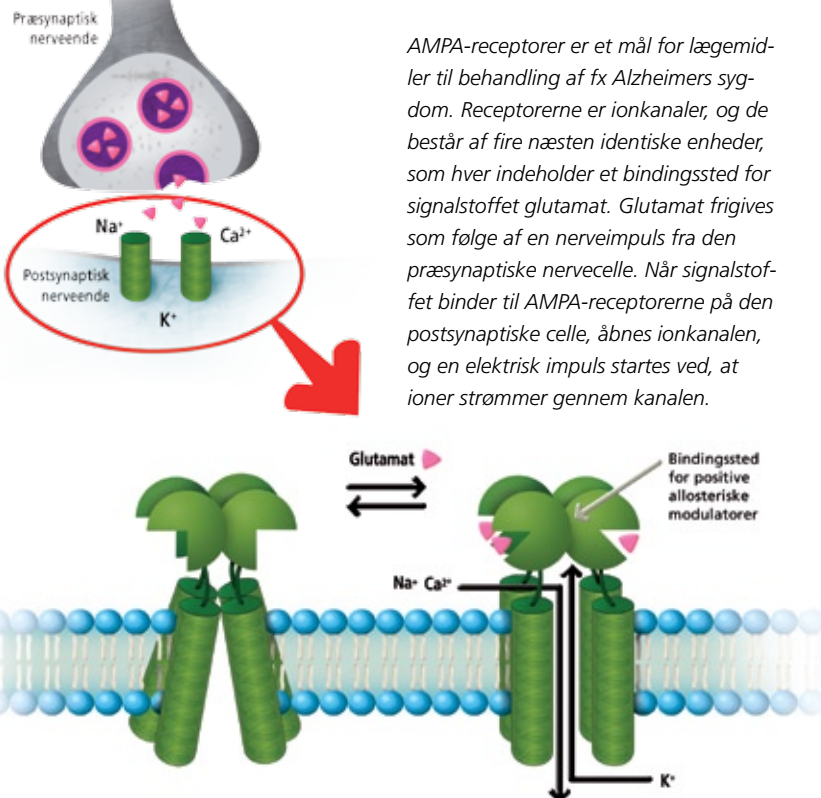
Glutamat frigives som følge af en nerveimpuls fra den præsynaptiske nervecelle, og AMPA-receptorerne på den postsynaptiske nervecelle sørger for, at impulsen sendes videre. Når glutamat binder sig en AMPA-receptor, åbnes ionkanalen, og en elektrisk impuls startes via de ioner, som strømmer gennem kanalen. En gruppe stoffer kaldet positive allosteriske modulatorer forstærker den normale strøm af ioner gennem receptoren og er derfor i fokus som potentielle lægemiddelstoffer.

## En god ide

Ideen med at konstruere en dimer af modulatorerne opstod under et ph.d.-projekt i gruppen for Biostrukturel Forskning på Institut for Medicinalkemi. Baggrunden herfor var den første tilgængelige røntgenstruktur af en AMPA-receptor i kompleks med en modulator, kaldet Cyclothiazide (CTZ). Den tredimensionelle struktur viser, at AMPA-receptoren indeholder to ens bindingssteder for CTZ relativt tæt på hinanden i den symmetriske grænseflade mellem to receptorenheder.

Vi beregnede en overflade af området i receptoren og fandt, at en smal kanal forbinder de to bindingssteder, så de

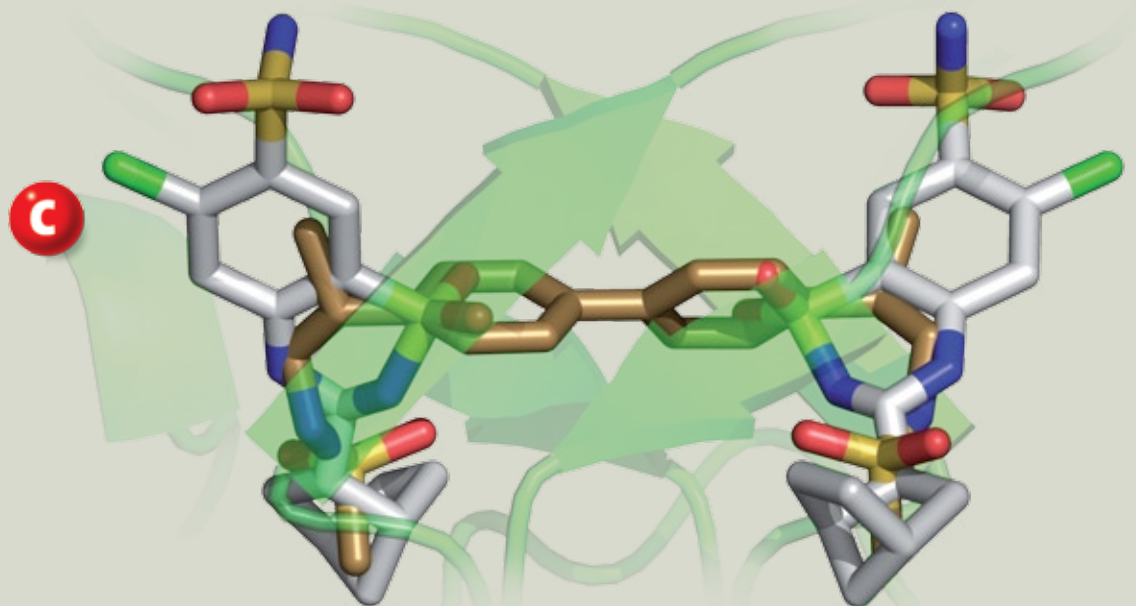
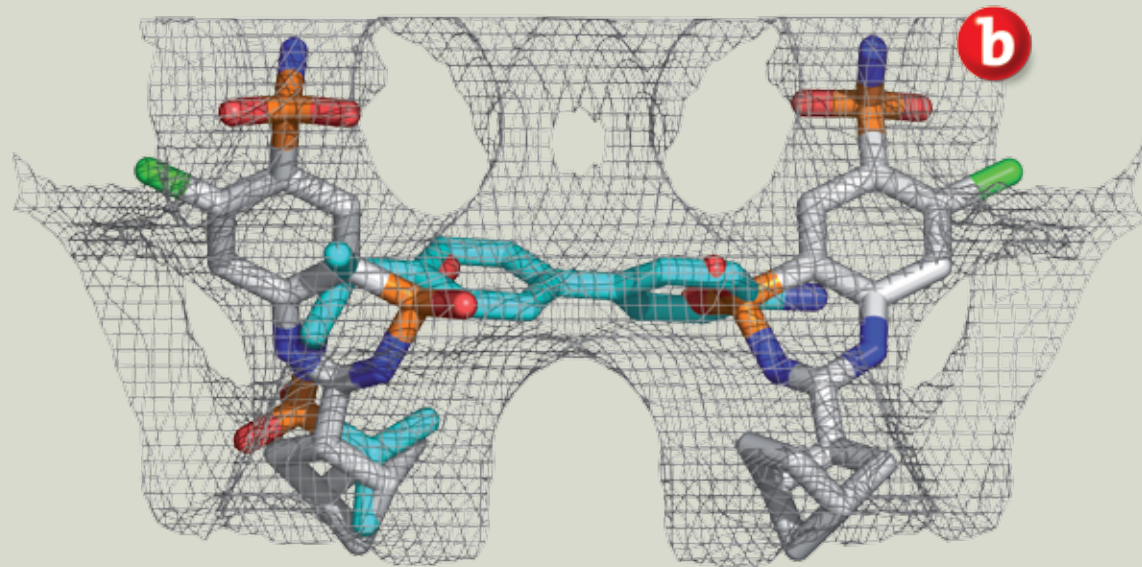
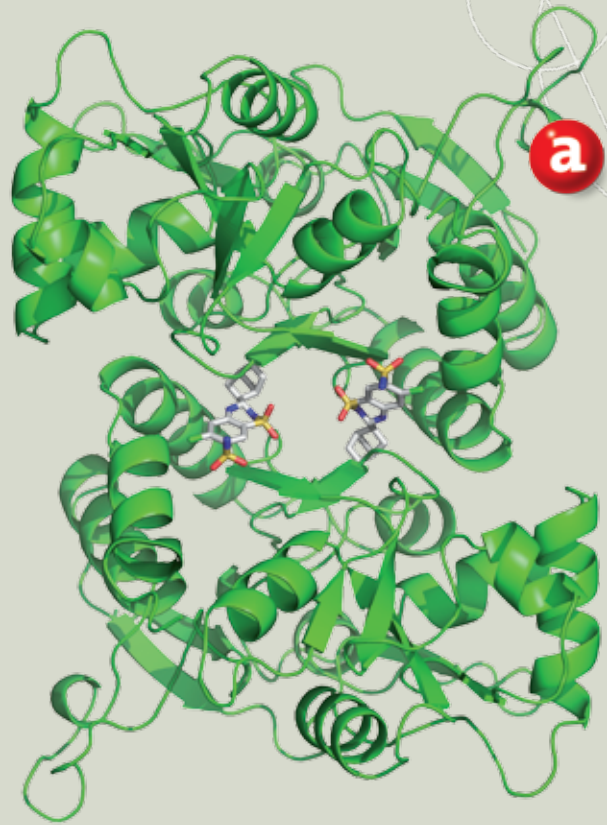
*AMPA-receptorer er et mål for lægemidler til behandling af fx Alzheimers sygdom. Receptorerne er ionkanaler, og de består af fire næsten identiske enheder, som hver indeholder et bindingssted for signalstoffet glutamat. Glutamat frigives som følge af en nerveimpuls fra den præsynaptiske nervecelle. Når signalstoffet binder til AMPA-receptorerne på den postsynaptiske celle, åbnes ionkanalen, og en elektrisk impuls startes ved, at ioner strømmer gennem kanalen.*

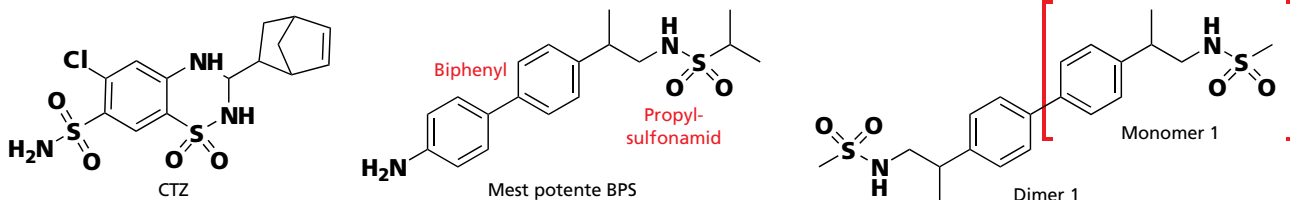


**a** Røntgenstrukturen af den glutamat-bindende del af en AMPA-receptor i kompleks med modulatorene CTZ (hvide kulstofatomer).

**b** Computermodellen viser, hvordan BPS-modulatorerne (cyane kulstofatomer) binder i forhold til CTZ i den beregnede overflade af receptorhulrummet.

**c** Den eksperimentelt bestemte røntgenstruktur af en AMPA-receptor i kompleks med dimer 1 (brune kulstofatomer) sammenlignet med CTZ. Strukturen er i god overensstemmelse med den forudsagte bindingsmåde.





Strukturformler for CTZ, den mest potente af BPS-modulatorerne, samt dimer 1 og monomer 1.

tilsammen danner et symmetrisk hulrum. Dermed åbnes muligheden for at designe et symmetrisk molekyle, der på samme tid kan binde til begge CTZ-bindingssteder. CTZ var dog ikke oplagt som udgangspunkt for at designe en dimer. Det var derfor nødvendigt at identificere andre modulatorer, som binder i samme område af receptoren.

### Computergenereret bindingsmodel

En serie af modulatorer, biarylpropylsulfonamider (BPS), blev fundet i litteraturen med tilhørende aktivitetsdata, og de viste sig at indeholde lige det strukturelement, vi havde brug for. En af modulatorerne var tidligere publiceret i forbindelse med en mutation i receptoren, der havde en tydelig effekt på stoffets virkning. At denne mutation samtidig havde vist sig at påvirke effekten af CTZ, var en klar indikation på, at der var tale om samme bindingssted.

Vi benyttede et computerprogram til at generere forslag til, hvordan BPS-modulatorerne kunne passe ind i en røntgenstruktur af AMPA-receptoren. Ved at beregne og vurdere forskellige faktorer, som influerer på stoffernes bindingsaffinitet, udvalgte vi den mest sandsynlige bindingsmåde for hver BPS-modulator. På baggrund af modulatorernes interaktioner med receptoren, fx via hydrogenbindinger, kunne vi forklare, hvorfor nogle af stofferne er mere effektive end andre. For at evaluere den forudsagte binding til AMPA-receptoren, delte vi serien af modulatorer i to grupper; et træningssæt og et testsæt. Træningssættet blev brugt til at konstruere en computermodel, der identificerede en mulig sammenhæng mellem modulatorernes tredimensionelle struktur og deres virkning på receptoren. Det faktum, at computermodellen kunne forudsige aktiviteten af BPS-modulatorerne i testsættet, bekræftede, at vores forslag til, hvordan de binder, var korrekt. Bindingsmodellen kunne derefter bruges som udgangspunkt for videre studier.

### Design af en dimer

De fleste af BPS-modulatorerne indeholder et biphenyl-strukturelement, der udover selv at være symmetrisk viste sig at binde midt i det symmetriske hulrum. Propylsulfonamid-delen af disse modulatorer binder til samme sted, som et af de to CTZ molekyler. Derfor var der ikke langt til ideen med en dimer, der indeholder to propylsulfonamid-enheder med en biphenyl-enhed i midten. Vi designede et par forslag til di-

merer og undersøgte, om de passede ind i bindingsmodellen for BPS-modulatorerne.

Kun dimer 1 blev forudsagt til at have en fuldstændig symmetrisk binding til de to CTZ-bindingssteder. Samtidig forudsagde computerberegningerne en høj bindingsaffinitet for dimer 1 og dermed sandsynligvis også en god virkning på receptoren.

### Bevis for binding og effekt

Alt arbejdet var indtil nu foretaget på computer. Bindingen af dimer 1 til to identiske bindingssteder var derfor kun teori uden konkrete beviser. Desuden var det ikke belyst, hvilken effekt, der kunne opnås fra dimeren i forhold til monomeren af samme stof.

Derfor etablerede vi et samarbejde med Chem-MedChem forskningsgruppen på Institut for Medicinalkemi med henblik på fremstilling af modulatorerne og med Sektionen for Cellulær Neurofarmakologi på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi med henblik på test af modulatorernes virkning på AMPA-receptorerne. Dimer 1 og monomer 1 blev derpå fremstillet og testet på rekombinante AMPA-receptorer, som var udtrykt i cellemembranerne på levende frøæg. Desuden startede gruppen for Biostrukturel Forskning et eksperiment med at løse røntgenstrukturen af en AMPA-receptor i kompleks med dimer 1.

De farmakologiske tests viste, at både dimer 1 og monomer 1 forøgede strømmen af ioner gennem AMPA-receptorerne med mellem 700 og 1000 procent i forhold til kontrolmålinger uden en modulator. Desuden viste resultaterne, at dimer 1 er over 1000 gange mere potent end monomer 1. Røntgenstrukturen viser, at dimer 1 binder i grænsefladen mellem to receptorenheder. Biphenyl-elementet placerer sig i midten af hulrummet, mens propylsulfonamid-enhederne anbringer sig i de to identiske CTZ-bindingsteder.

Resultaterne bekræfter helt tydeligt, at fremstilling af dimere, som binder til to identiske bindingssteder, kan føre til udvikling af langt mere potente lægemidler. I den forbindelse bliver dimer 1 i øjeblikket undersøgt for en potentielt fremmende effekt på kognitive egenskaber hos forsøgsdyr. Samtidig stemmer røntgenstrukturen godt overens med computermodellen, hvilket viser, at computerværktøjer kan være en yderst effektiv hjælp ved design af nye potentielle lægemiddelstoffer.

*Ph.d. Kasper Harpsøe er postdoc på Institut for Medicinalkemi.*

*Cand.scient. Birgitte H. Kaae er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.*

*Ph.d. Thomas Balle er lektor på Institut for Medicinalkemi.*

*Ph.d. Darryl S. Pickering er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.*

*Ph.d. Jette S. Kastrop er lektor på Institut for Medicinalkemi.*