

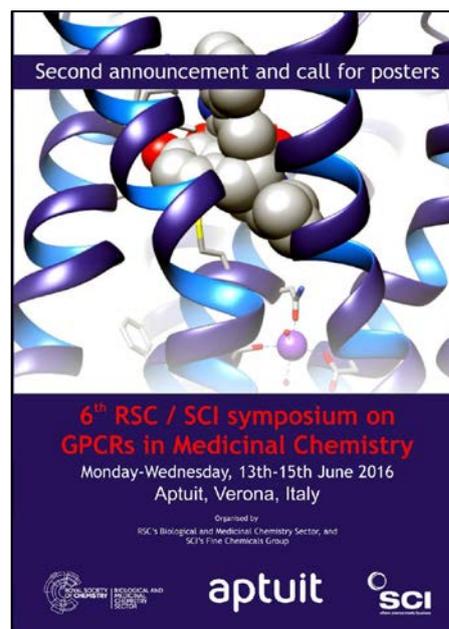
6TH RSC/SCI SYMPOSIUM ON GPCRS IN MEDICINAL CHEMISTRY: riuniti a Verona gli esperti internazionali di GPCR drug discovery

Fabrizio Micheli, Nerina Coppini

Aptuit, Verona

fabrizio.micheli@aptuit.com, nerina.coppini@aptuit.com
www.aptuit.com

Il Centro di Drug Discovery & Development Aptuit di Verona ha ospitato nello scorso giugno il "6th RSC/SCI Symposium on GPCRs in Medicinal Chemistry", per presentare e discutere le più recenti innovazioni sul ruolo chiave dei recettori accoppiati alle proteine G nella fisiopatologia umana ed il loro ruolo chiave nella medicina moderna.



Dal 13 al 15 giugno 2016, il Centro di Drug Discovery & Development Aptuit di Verona ha ospitato il "6th RSC/SCI Symposium on GPCRs in Medicinal Chemistry", evento organizzato dalla Royal Society of Chemistry (RSC) in collaborazione con la Society of Chemical Industry (SCI) e supportato da Aptuit in veste di sponsor principale.

Al simposio hanno partecipato oltre un centinaio di delegati provenienti da ogni parte del mondo in rappresentanza sia del mondo dell'accademia che dell'industria farmaceutica. Hanno partecipato anche alcuni PhD students, per i quali erano state istituite borse di studio da parte della RSC.

Il filo conduttore del meeting è stato il ruolo chiave di recettori accoppiati alle proteine G [G-protein coupled receptors (GPCRs)] nella fisiopatologia umana, a sottolinearne ulteriormente il loro ruolo chiave nella medicina moderna.

L'evento ha unito elementi chiave della scienza quali le ultime frontiere della chimica medicinale, esempi di "structural biology" innovativi e nuovi approcci al drug design. Da segnalare anche, e non meno importante, la trattazione di argomenti relativi alla modulazione allosterica ed al "biased signalling" che sono stati oggetto di alcune delle presentazioni.

Dopo una breve cerimonia di apertura e benvenuto a cura del Dr. Simone Braggio (VP, Drug Design & Discovery di Aptuit) e del Dr. Adrian Hall (UCB, Co-chairman del comitato organizzatore), il primo speaker della giornata è stata la Dr.ssa Fiona Marshall (Heptares Therapeutics, UK) con una lecture dal titolo "The seventh millennium of GPCR drug discovery" durante la quale ha sviluppato un percorso che, partendo dalla storia dei GPCRs in drug discovery negli ultimi vent'anni, si è poi focalizzato sui nuovi sviluppi nel campo ed in particolare della modellistica molecolare nei confronti della modulazione di tipo allosterico.

Non sono mancati accenni alla modulazione epigenetica dei GPCRs e al loro legame diretto con la malattia. A questo esempio vale anche la pena di citare un'interessante pubblicazione in merito da parte di Dogra *et al.* [1]. Sono stati poi forniti dettagli tecnici relativamente al "Biophysical Mapping", "Water network energetics" ed infine a "GRID hotspots & surfaces" per sottolineare quanto tuttora lo Structure Based Drug Design (SBDD) relativo ai siti di binding di tipo allosterico presenti parecchie complessità; in particolare la presenza di siti allosterici in più punti del recettore, la loro comparsa a seguito di un "induced fit" da parte del



ligando ortosterico e la difficoltà di ottenere strutture co-cristallizzate rappresentano chiaramente dei limiti che dovranno essere superati nel prossimo futuro.

La seconda speaker della giornata è stata la Dr.ssa Irina Tikhonova (School of Pharmacy, Queen's University Belfast, UK) con una presentazione dal titolo "Insights into chemistry and biology of GPCRs from molecular modelling". La Dr.ssa Tikhonova si è soffermata sul ruolo del modelling ed in particolare sulla "ligand recognition" applicata sia in presenza che in assenza di tecniche di "dinamica molecolare".

Si è poi inoltrata nel campo degli "Structure-based Virtual Screens" ed in particolare su quelli che sono stati ripostati in letteratura. Alcuni di essi sono stati eseguiti nei confronti di strutture cristalline (e.g. recettori β_2 , D_3 , A_{2A} , CXCR4 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} and H₁), altri su recettori costruiti per omologia (e.g. D_3 , CXCR3, A_1 , A_3 , MCH1, H₄, TRH1, FRP, GLR, GLP-1, CCR5) ed infine su quelli costruiti per omologia su recettori "orfani" (e.g. GPR40, GPR17, GPR68, GPR65).

I risultati di questi screening virtuali hanno portato a nuovi chemotipi, modulatori duali ed a ligandi molto promettenti che possono risolvere, potenzialmente, alcuni problemi di selettività evidenziati nel passato su alcuni recettori.

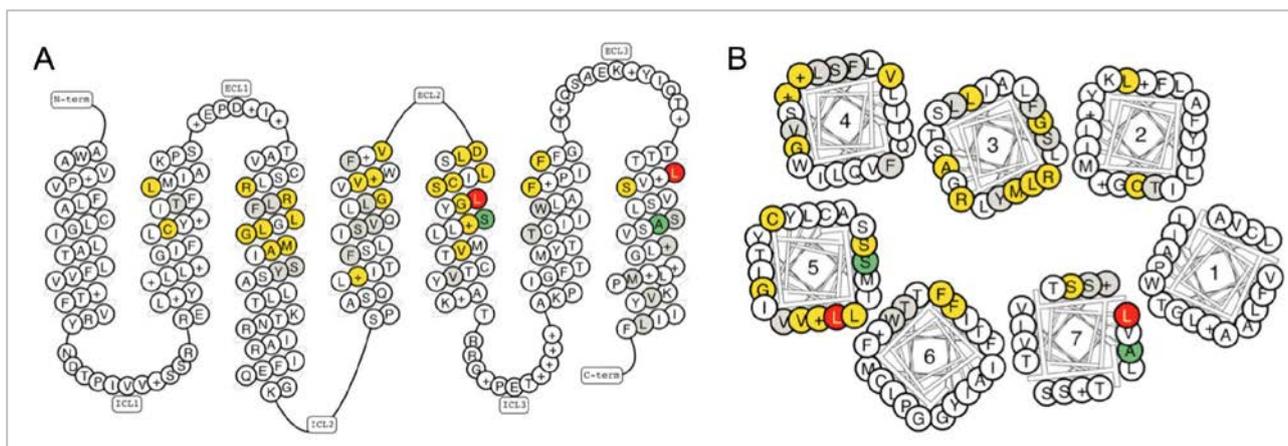
Infine, dopo essersi inoltrata nella tematica del "Biased Signalling" e dell'accoppiamento attraverso le β -arrestine, si è soffermata sul recettore Cholecystokinin 2 Receptor (CCK₂) ed in particolare sulla struttura GV150013X identificata presso il Centro Aptuit alcuni anni orsono.

Dopo la sessione poster gli speakers successivi sono stati il Dr. Olivier Corminboeuf (Actelion, Svizzera) che ha parlato di "Biased agonism @ FPR2", il Dr. Roger Norcross (Roche Pharma Research & Early Development, Svizzera) con una presentazione intitolata "TAAR1 agonists - a new approach for the treatment of psychiatric disorders" ed il Dr. Christofer Tautermann (Boehringer Ingelheim, Germania) che ha parlato di "Binding of anticholinergics to the M3 receptor: explaining kinetics by mutagenesis and molecular dynamics simulations".

Tutte tre le presentazioni sono state di altissimo livello e contenuto scientifico. Purtroppo per ragioni di riservatezza industriale, non possiamo fornire un sunto dettagliato del loro contenuto.

I successivi tre speakers hanno reso il pomeriggio molto interessante. Si è trattato del Dr. Gyorgy Snell (Takeda California, USA) che ha parlato di "High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875", del Dr. Ravi Nargund (Merck, USA) che ha esposto "Design, synthesis and pharmacological profile of the GPR40 receptor agonist MK-8666" e del Dr. Kasper Harpsoe (Department of Drug Design and Pharmacology, Copenhagen University, Danimarca) che ha presentato una lezione dal titolo "Comparative GPCR structure and mutagenesis analyses in ligand modeling".

Anche in questo caso, per quanto riguarda i primi due speaker non ci è possibile fornire dettagli della presentazione, mentre per quanto riguarda il relatore accademico si è trattato di un interessante ed elegante *excursus* sulle attività dell'Università di Copenhagen riguardo gli aspetti di Chemo-informatics, Computing in Mathematics, Natural Science, Engineering e Medicine. In particolare si è soffermato su di un sistema informatico di recente pubblicazione da parte del gruppo di ricerca con cui collabora: "GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors" per i cui dettagli si rinvia alla relativa pubblicazione [2].



(immagine tratta da [2])

La seconda giornata di simposio si è aperta con una Plenary lecture a cura del Prof. Stefano Moro (Molecular Modeling Section, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, Università di Padova) con un'interessantissima lezione dal titolo "Recent computational trends in exploring G protein-coupled receptor (GPCR) ligand recognition pathways". Il Prof. Moro ha evidenziato le interazioni tra recettore e ligando all'interno di un sistema bio-cristallografico e delle informazioni fornite dai raggi X. È poi passato a presentare le differenze tra "Molecular Docking e Molecular Dynamics" [3].

Per gli addetti del settore è risultato ovvio come la "Unbiased Molecular Dynamics" porti alla necessità di mezzi computazionali disponibili a poche realtà [4]; il Prof. Moro ha presentato la "Supervised Molecular Dynamics (SuMD)" [5], una tecnica che può computare il legame al sito di binding in nanosecondi con il semplice utilizzo di un laptop, frutto del lavoro tutto italiano del gruppo dell'Università di Padova.

Dopo aver spiegato la tecnica in maggior dettaglio, sono state esemplificate alcune applicazioni pratiche relative ai recettori adenosinici.

La mattinata è proseguita con altre due presentazioni industriali da parte del Dr. Roland Bürli, (AstraZeneca e MedImmune, UK) relativamente a "Discovery of small molecule modulators of the protease activated receptor-2 (PAR2)" e del Dr. Bruce Ellsworth (Bristol-Myers Squibb, USA) con "Nutrient sensing GPCR FFAR1 (GPR40): allosteric agonist binding mode and physical properties influence agonist pharmacology".

Di queste due presentazioni industriali, come nei casi precedenti, non è possibile diffondere informazioni.

La presentazione del Dr. Jonathan Mason (Heptares Therapeutics, UK) "Roles of waters to predict binding affinity, selectivity and kinetics: a key component of high end GPCR SBDD" ha evidenziato il ruolo chiave delle molecole d'acqua presenti nei cristalli o nei modelli costruiti per omologia al fine di predire con correttezza il "binding mode" dei ligandi all'interno del sito di legame nel recettore.

In particolare, il Dr. Mason si è soffermato sul ruolo delle molecole d'acqua "infelici" all'interno dei siti di binding ("unhappy" waters) citando molti esempi di successo nel caso in cui il design molecolare ne abbia tenuto conto. Infatti, secondo le sue considerazioni, non è solo importante considerare lo spiazzamento delle acque stesse, quanto anche tenere in debita considerazione le perturbazioni nel network dei legami che queste creano. Lo Structure Based Drug Design diventa molto più efficiente considerando non solo la struttura proteica del GPCR e le sue interazioni col ligando, ma anche valutando appropriatamente il network creato dalle molecole di acqua.

Le metodiche evidenziate per questo tipo di considerazioni sono state diverse, includendo la FEP (Free energy perturbation) e le simulazioni di dinamica molecolare (MD).

Secondo il Dr. Mason, infatti, i recenti miglioramenti nei "force fields" e la possibilità di avere tempi di simulazione molto più rapidi grazie all'avvento delle GPUs, rendono ora gli studi di MD un approccio standard a questo tipo di problematiche. L'uso delle molecole d'acqua "infelici" migliora inoltre notevolmente l'approccio alla selettività dei composti, utilizzando per esempio molecole più piccole ma che siano in grado di intrappolare una molecola "infelice" in un recettore che rappresenti un problema di "off-target". Infine, sempre secondo il Dr. Mason, anche studi cinetici possono trarre benefici da questa teoria, utilizzando il network di acque per modellare le K_{off} . Un'interessante review scritta dal Dr. Mason su questi argomenti è disponibile al riferimento [6].

Lo speaker successivo è stato il Dr. Andreas Haupt (AbbVie, Germania) che ha parlato di "Design and synthesis of highly selective 5-HT_{2C} receptor agonists as potential novel treatment for neuropsychiatric diseases", mentre il Dr. Travis Wager (Pfizer, USA) ha presentato una comunicazione su "Dopamine D₃/D₂ antagonist PF-04363467 attenuates drug-seeking behaviour without concomitant D₂ side effects".

Del primo relatore non è possibile descrivere dati, mentre del secondo, essendo la stessa lezione già stata divulgata in altri siti è possibile dare un sintetico sunto.

Il Dr. Wager ha fatto una breve descrizione del prodotto PF-04363467, un antagonista dei recettori dopaminergici D₃ e D₂. È partito a narrare la storia dai risultati di screening per descrivere passo passo la modifica della molecola e la sua funzionalizzazione addizionale. L'ottimizzazione ha riguardato aspetti metabolici (i punti di partenza erano forti inibitori del citocromo P450). Studi di mutagenesi hanno aiutato ad indirizzare ed evidenziare il "binding mode" delle nuove molecole in un sito, probabilmente allosterico, sul recettore [7]. Sfortunatamente, l'affinità elevata al citocromo Cyp2C19 e l'alta clearance intrinseca non hanno permesso di far progredire ulteriormente la molecola in questione.

Altre due presentazioni industriali, di cui non possiamo fornire indicazioni precise, sono state a cura del Dr. Michiel Van Gool (Janssen, Belgio) che ha parlato di "Discovery of mGluR2 negative allosteric modulators

for the treatment of neuropsychiatric disorders” e del Dr. Hayley Sharp (Cambridge Institute for Medical Research, UK) con una lezione molto interessante su “Acquired resistance to smoothed inhibitors in cancer patients”.

La lezione plenaria del pomeriggio è stata tenuta dal Prof. Vsevolod (Seva) Katritch (University of Southern California, USA) ed ha avuto il seguente titolo: “Are we there yet? How many unique GPCR structures needed?” La lezione, didattica e applicativa allo stesso tempo, ha parlato dei metodi di “decifrazione” delle basi molecolari con cui i GPCRs interagiscono con i vari ligandi, cofattori e con i loro effettori. A questo riguardo, elementi di Structure Based Drug Discovery sono stati evidenziati in relazioni alla scoperta ed ottimizzazione sia di “leads” che di “tool compounds” con nuove proprietà funzionali di modulazione allosterica e di “biased signaling”.

Scopo finale dell’esercizio presentato era quella di capire al meglio la biologia umana e migliorare l’esplorazione di nuovi processi innovativi che possano condurre all’identificazione di nuovi farmaci.

La seconda giornata è stata completata da presentazioni flash di due minuti ciascuna di alcuni posters selezionati dal comitato organizzatore.

Riportiamo qui la lista completa:

- Diana Alcobia (University of Nottingham, UK): Investigation of G-Protein-Coupled Receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes using Bioluminescence Energy Transfer (BRET);
- Frank Bernhard (Goethe Institute, Germania): Quality tuning and pharmacological characterization of cell-free synthesized G-protein coupled receptors in customized membranes;
- Vittorio Canale (Jagiellonian University Medical College, Polonia): Towards metabolically stable arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethyl piperidines as potent and selective 5-HT₇ receptor antagonists;
- Agostino Cilibrizzi (Imperial College London, UK): New small-molecule fluorescent probes for FPR optical visualization;
- Irene Coin (University of Leipzig, Germania): Binding paths of peptide agonists and antagonists on a Class B GPCR mapped by genetically encoded chemical probes;
- Andrew Green (DiscoverX, UK): Quantifying signalling bias: a simple approach to quantify functional selectivity and agonist bias;
- Jolanta Jaśkowska (Cracow University of Technology, Polonia): The impact of modifying the structure of selected hexyl arylpiperazines on the activity for 5-HT₁/5-HT₇ receptors;
- Ádám Andor Kelemen (Hungarian Academy of Sciences, Ungheria): A structure-based consensus scoring scheme for selecting class-A aminergic GPCR fragments;
- Jiafei Mao (Goethe University Frankfurt, Germania): Peptide ligand SAR of bradykinin 1 receptor explained by solid-state NMR;
- Noha Osman (German University in Cairo, Egitto): Design and synthesis of novel heterocyclic-based chemotypes as potent and selective CB₂ ligands;
- Anirudh Ranganathan [Stockholm University (Scilifelab, Svezia): Fragment-based discovery of subtype selective adenosine receptor ligands from homology models;
- Esther Sala (Intelligent Pharma SL, Spagna): A virtual screening platform to identify selective ligands within GPCRs subfamilies;
- Lea Santu (University of Nottingham, UK): The application of NanoBRET for the characterisation of subtype selective dipeptide-linked fluorescent Propranolol derivatives for human β ₁ and β ₂ adrenoceptors;
- Giovanna Tedesco (Cresset, UK): Generating accessible and novel R-groups and scaffolds for GPCR projects;
- Hsin-Yung Yen (University of Oxford, UK): Specific anionic lipids interaction and allosteric modulation of GPCR;
- Richard Mould (Heptares Therapeutics Ltd, UK): Characterisation of the kinetics of binding of orexin antagonists at the OX₁ receptor;
- Juan Carlos Mobarec (University of Essex, UK): Molecular dynamics of active state GLP-1R bound to either GLP-1 or oxyntomodulin.

L'ultima mattinata di lavori si è aperta con una lezione della Dr.ssa Bernadette Byrne (Imperial College London, Department of Life Sciences, UK) con una lezione incentrata su "What happens when you thermostabilise a GPCR?".

La lezione è iniziata con un'introduzione sulla flessibilità conformazionale applicata alla teoria recettoriale ed alle conseguenze che si evidenziano mutando le proteine di membrana per incrementare la stabilità dei recettori.

In particolare sono stati presentati dati sui mutanti termostabilizzati del recettore Adenosina A_{2A} con lo scopo di capire a livello molecolare cosa rende i mutanti termostabili e per esplorare il ruolo preciso di questi residui nella funzionalità del recettore.

Sono stati presentati dettagli relativi ai mutanti, alla loro costruzione ed espressione, nonché un'analisi completa della loro funzionalità. La Dr.ssa Byrne è poi passata ad analizzare l'influenza delle mutazioni sul accoppiamento con le proteine G, evidenziando la perdita dell'attività costitutiva del recettore A_{2A} ed analizzando in dettaglio i risultati riportati.

La giornata si è conclusa con le presentazioni del Dr. Zara Sands (UCB, Belgio) con una dissertazione su "An integrated ligand and structure-based approach for the rational identification of novel dual acting A_{2A}/NR2B antagonists: value of X-Ray crystallography for understanding an A_{2A} activity cliff", della Dr.ssa Christel Menet (Confo Therapeutics, Belgio) che ha parlato della nuova tecnologia di screening "The Confo®body technology, a new platform to enable fragment screening on GPCRs" e del Dr. Werngard Czechtizky (Sanofi) con una presentazione relativa a "LPARs - recent progress and medchem approach towards LPAR5".

Di questi relatori non ci è possibile fornire un riassunto dettagliato per i motivi descritti in precedenza.

La conferenza si è conclusa con le parole del Dr. David Miller, Co-chairman of the GPCRs Organising Committee UK, sottolineando l'ottima riuscita del congresso grazie ai relatori, partecipanti, sponsor, espositori e della sede Aptuit ospitante.

Aptuit, oltre alla sponsorizzazione ed all'uso degli spazi congressuali, ha partecipato al lavoro organizzativo dell'evento grazie al contributo del Dr. Fabrizio Micheli nel comitato organizzatore.

Tutti i partecipanti hanno dato una valutazione estremamente positiva del simposio, sia dal punto di vista dei contenuti scientifici sia sugli aspetti organizzativi e logistici. È notizia di questi giorni che il comitato organizzatore ha scelto nuovamente il Centro Aptuit per la settima edizione del simposio, che si terrà nel 2018.

BIBLIOGRAFIA

¹S. Dogra *et al.*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016; DOI: 10.1016/j.biocel.2016.03.012

²V. Isberg *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**, D356; DOI: 10.1093/nar/gkv1178

³A. Ciancetta, S. Moro, *TIPS*, 2015, **36**, 878.

⁴E. David, *Shaw Annu. Rev. Biophys.*, 2012, **41**, 429.

⁵D. Sabbadin, S. Moro, *J. Chem. Inf. Mod.*, 2014, **54**, 372.

⁶J.S. Mason *et al.*, *In Silico Pharmacology* 2013, **1**, 23.

⁷T.T Wager *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, 2010, **1**, 435.