

ALLOSTERICKÁ VAZEBNÁ MÍSTA JAKO MOLEKULÁRNÍ CÍLE PRO VÝVOJ, DESIGN A PŮSOBNÍ NOVÝCH LÉČIV

HASSAN FARGHALI a NIKOLINA KUTINOVÁ
CANOVÁ

*Farmakologický ústav, 1. lékařská fakulta Univerzity
Karlovy v Praze, Albertov 4, 128 00 Praha 2
hassan.farghali@lf1.cuni.cz*

Došlo 27.9.12, přepracováno 9.10.12, přijato 31.10.12.

Klíčová slova: allosterický efekt, allosterické místo, GABA_A receptorový komplex, kalcimimetika, sirtuin 1

Obsah

1. Úvod
2. Příklady léčiv s allosterickým působením
 - 2.1. Příklady léčiv ovlivňujících GABA_A receptorový komplex
 - 2.2. Allosterické modulatory receptoru pro kalcium
 - 2.3. Allosterické aktivátory sirtuinu 1: resveratrol a příbuzné látky
3. Závěr

1. Úvod

Allosterická modulace receptoru nebo regulačních bílkovin vyplývá z vazby allosterických modulatorů na místě („regulační místo“) odlišném od vazebného místa pro endogenní ligand („aktivní místo“), čímž dochází k zesílení nebo oslabení účinků endogenního ligandu. Za normálních okolností vazba allosterického modulatoru způsobí konformační změnu v receptoru molekuly, což má za následek změnu vazebné afinity ligandu k receptoru. Tímto způsobem allosterický ligand moduluje aktivaci receptoru jeho primárním (orthosterickým) ligandem a může tak být přirovnán k regulátoru elektrického napětí v elektrickém obvodu, který zesiluje intenzitu reakce. Jako koncept byl allosterismus navržen a rozpracován před více jak 60 lety Monodem a spol. z důvodu, aby byl poskytnut rámec pro interpretaci experimentálních studií zabývajících se regulací funkcí proteinů^{1,2}. Konkrétně byl termín allosterická inhibice použit také Monodem a Jakobem v dřívější studii, která byla prezentována roku 1961 na sympoziu zaměřeném na buněčné regulační mechanismy³. V přehledovém článku Peracchiho a spol.² o zkoumání a využívání konceptu allosterie autoři uvedli, že allosterie se týká proteinů, které obsahují alespoň dvě vazebná místa

pro dva ligandy. Zároveň však bylo poukázáno na to, že přítomnost dvou vazebných míst a dvou ligandů nemusí nutně znamenat, že se jedná o allosterický protein, protože vazba ligandu na jednom místě nemusí mít vliv na vazbu ligandu na druhém místě. Kromě toho si autoři položili zajímavou otázku, zda je pro protein „výhodné“ vázat dva ligandy bez vnitřní komunikace? Odpověď byla pozitivní, jak je vysvětleno níže na několika příkladech z oblasti allosterie a mechanismu účinku léčiv. V podstatě, navázání ligandu na allosterické místo, které ovlivní funkci vzdáleného aktivního místa, využívá flexibilitu bílkovin a možnost obnovení původního rozložení energie proteinů. Jak monomerní, tak oligomerní proteiny mohou být allosterické. Zatímco bylo v posledních desetiletích analyzováno chování allosterických systémů v mnoha studiích, nyní jsou neustále vyvíjeny obecné teoretické modely za účelem interpretace experimentálních výsledků.

Allosterie je aktuálně považována za základní mechanismus regulace ve všech organismech, který řídí různé procesy jako např. regulaci metabolismu, funkci receptoru, transport ligandu a motilitu buněk. V pozadí tohoto procesu stojí zřejmě evoluční tlaky, které upřednostňují a formují rozvoj allosterických znaků ve specifických makromolekulárních systémech. Posledně zmiňovaná charakteristika je vzhledem k běžnému výskytu allosterie využívána pro vývoj a design nových léčiv, která se váží na allosterická místa a vedou tak k nabytí nebo ztrátě funkce cílové struktury. Tyto látky jsou nyní známy jako allosterická léčiva.

V současné době je také zřejmé, jak důležitý je biologický výskyt allosterické regulace založené na vnitřní flexibilitě bílkovin, která vysvětluje, proč je allosterie stále více využívána pro léčebné účely a proč vznikl obor allosterických léčiv vyhledávající nové terapeutické molekuly^{2,4–6}. Allosterická léčiva jsou ve skutečnosti molekuly vyvinuté za účelem aktivace nebo inhibice proteinu, jak bylo ostatně podrobně popsáno různými autory^{2,7}. Tato léčiva zaměřená na allosterická vazebná místa (allosterická léčiva) mohou oproti neallosterickým proteinovým modulatorům vykazovat výhody, jakými jsou vyšší selektivita a nižší výskyt nežádoucích účinků. Tyto pozitivní účinky allosterických léčiv mohou být zapříčiněny tím, že allosterická místa jsou většinou umístěna distálně od aktivního místa v nekonzervovaných oblastech enzymů. Proto při konstrukci nových léků zacílených na tyto oblasti je rozumné předpokládat, že příprava allosterických modulatorů bude vykazovat selektivnější profil.

Tento přehledný referát se nezabývá problematikou allosterických proteinů, které již byly popsány vysoce specializovanými odborníky v oblasti chemie a biologie bílkovin, ale spíše se pokusí nastínit některé slibné aspekty allosterie ve vývoji léků s názornými příklady, které demonstrují terapeutický potenciál tohoto aktuálního tématu.

2. Příklady léčiv s allosterickým působením

2.1. Příklady léčiv ovlivňujících GABA_A receptorový komplex

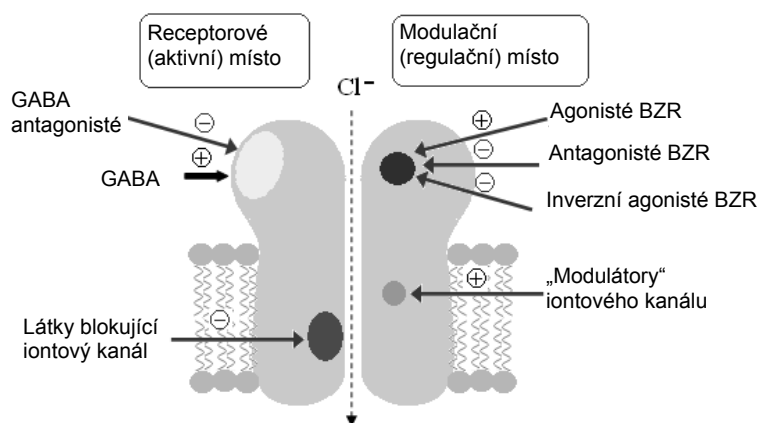
Klasickým příkladem je GABA_A receptorový proteinový komplex, jehož aktivním místem je vazebné místo pro neurotransmiter γ -aminomáselnou kyselinu (GABA). GABA interaguje s iontovými kanály spřaženými s ligandem díky vazbě na GABA_A receptor (GABA_A-R) a zvyšuje tak influx chloridových iontů do cytoplasmy nervových buněk, což vede k hyperpolarizaci membrán neuronů a k prohloubení postsynaptického inhibičního potenciálu. GABA_A receptorový komplex obsahuje také několik různých allosterických vazebných míst, která upravují aktivitu receptoru nepřímou. Tato allosterická regulační místa jsou cílem pro působení řady léků, včetně benzodiazepinů, nebenzodiazepinových hypnotik, barbiturátů, ethanolu, neuroaktivních steroidů, inhalačních anestetik, pikrotoxinu a dalších. Různé látky mohou působit jako agonisté nebo antagonisté na neurotransmiterovém receptorovém místě nebo na modulačních místech (např. na benzodiazepinovém receptoru) sdružených s receptorem pro GABA. Některé z těchto látek se mohou vázat na jednom nebo také na více odlišných místech iontového kanálu. Mechanismus, jakým „iontové modulátory“ (např. alkohol a celková anestetika) usnadňují otevírání tohoto iontového kanálu, není přesně znám; mohou mít vliv jak na vazebná místa pro ligand, tak na další vazebná místa kanálu⁸ (obr. 1).

GABA_A receptor je součástí GABA_A receptorového komplexu, jehož hetero-oligomerní pentamerická struktura je produktem exprese genové rodiny nesoucí informace pro 19 homologních podjednotek. GABA_A receptorový komplex je nejčastěji vytvářen kombinací podjednotek α , β a γ . Zastoupení jednotlivých isoformů těchto podjednotek vykazuje regionální heterogenitu (např. výskyt v odliš-

ných částech CNS), která souvisí s rozdílnými fyziologickými účinky. Jak bylo zmíněno výše, různé allosterické ligandy mohou modulovat GABAergní odpověď vazbou na odlišných místech GABA_A receptorového komplexu. Nejlépe popsaným allosterickým vazebným místem na GABA_A receptorovém komplexu je místo pro benzodiazepiny (BZ), které se nachází na rozhraní podjednotek α a γ . BZ se běžně terapeuticky využívají pro svoje účinky anxiolytické, antikonvulzivní, myorelaxační a hypnotické. Široké spektrum farmakologických účinků klasických BZ je zprostředkováno selektivní aktivací různých podtypů benzodiazepinového receptoru (BZR). Alfa 1 podjednotka BZR zprostředkovává sedaci, alfa 2 a alfa 3 podjednotky anxiolyzu a myorelaxaci, a alfa 5 podjednotka zhoršení kognitivních funkcí. Je velmi dobře známo, že úzkostné poruchy jsou spojeny se změnami v GABAergní neurotransmisí. Proto jsou na základě současných znalostí o rozmanitosti rodiny GABA_A receptorového komplexu využívány různé přístupy za účelem vyvinout nové léky zaměřené na GABA_A-R / BZR komplex se selektivním anxiolytickým a odděleným sedativně-hypnotickým působením. Čtenáře, kteří mají zájem získat více aktuálních poznatků o roli GABA_A-R / BZR komplexu při úzkostných poruchách s novými pohledy na molekulární biologii receptorového komplexu a o významu tohoto cíle při vývoji nových léčiv proti úzkosti, odkazujeme na poslední přehled Trincavelliho a spol.⁹ Ten svědčí o tom, do jaké míry může výzkum allosterických cílů GABA_A receptorové rodiny vést k vývoji selektivnějších léčiv s lepším bezpečnostním profilem.

2.2. Allosterické modulátory receptoru pro kalcium

V průběhu posledních několika let byl popsán řadou autorů významný klinický přínos allosterické modulace receptoru snímajícího kalcium („calcium sensing recep-



Obr. 1. Hypotetický model hlavních vazebných míst pro látky působící na GABA_A receptorovém komplexu⁸

tor“, CaR)^{10–13}. CaR patří do třídy/rodiny C membránových receptorů spřaženými s G-proteiny (GPCR). CaR je aktivován fyziologickými hladinami Ca^{2+} (a Mg^{2+}) a pozitivně modulován řadou proteinogenních L- α -aminokyselin. Nedávno bylo vyvinuto několik syntetických allosterických modulatorů, které působí buď jako pozitivní modulatory (nazývané kalcimimetika) nebo jako negativní modulatory (nazývané kalcilytika). Tyto modulatory neaktivují běžně se vyskytující („wild“) typ CaR přímo, ale spíše zapřičiňují posun křivky závislosti účinku na koncentraci buď doleva, nebo doprava tzn., že zvyšují, resp. snižují, citlivost tohoto receptoru na extracelulární koncentraci Ca^{2+} .

Stejně jako ostatní členové C rodiny GPCR, má i CaR tři molekulární domény: 1. extracelulární amino-terminální doménu, 2. hydrofobní transmembránovou doménu skládající se ze 7 podjednotek a 3. cytosolickou C-terminální doménu, která zprostředkovává intracelulární signalizaci. Ačkoliv se endogenní ligandy tohoto receptoru, tedy Ca^{2+} , Mg^{2+} a L- α -aminokyseliny, vážou na amino-terminální doménu, většina, pokud ne všechny, z doposud publikovaných syntetických modulatorů se váží na transmembránovou doménu. Nejvýznamnější fyziologickou funkcí CaR je udržení extracelulární hladiny Ca^{2+} ve velmi těsném rozmezí ovlivněním sekrece parathormonu (PTH). Vliv na sekreci kalcitoninu z C-buněk štítné žlázy a přímý účinek na ledvinné tubuly rovněž přispívají ke kontrole extracelulárních hladin Ca^{2+} . Tato kontrola nad plazmatickými hladinami PTH a Ca^{2+} je částečně ztracena u pacientů trpících primární nebo sekundární hyperparatyreózou. Perspektivy využití CaR jako léčebného cíle byly zdůrazněny schválením kalcimimetika (cinakalcetu) právě pro léčbu některých forem primární a sekundární hyperparatyreózy. Cinakalcet je první klinicky podávaný allosterický modulator působící na GPCR, a tak tato látka představuje významný doklad o koncepci budoucího vývoje allosterických modulatorů cíleně zaměřených na další GPCR. Negativní allosterické modulatory CaR, známé jako kalcilytika, mohou zvýšit vylučování PTH a jsou testovány jako potenciální kostní anabolika při léčbě věkem podmíněné osteoporózy. Současný stav vývoje a klinického využití řady pozitivních a negativních modulatorů CaR byly prezentovány v práci Warda a spol.¹² Kromě toho také klinické mutace CaR a transgenní myši nesoucí tkáňově specifické delece CaR přispěly k pochopení relativního funkčního významu CaR v kalciotropních tkáních.

Nedávné studie navíc naznačují, že allosterické modulatory nejen že mění funkce CaR lokalizovaného na cytoplazmatické membráně, ale že také regulují stabilitu CaR lokalizovaného na endoplazmatickém retikulu. Předpokládá se, že allosterická léčiva působí na několika buněčných organelách a mají tak pod kontrolou relativní zastoupení a tedy i funkci receptorů, a že hydrofobicita těchto látek může ovlivnit poměrné přispění plazmatické membrány a intracelulárních organel k výskytu a signalizaci CaR (cit.^{13,14}). Dokonce i imunohistochemické a funkční studie CaR na děložním hladkém svalu potkanů implikují velký potenciál využití cílených allosterických

léčiv jako terapeutických prostředků. Bylo totiž zjištěno, že CaR jsou exprimovány v hladké svalovině dělohy potkanů a že jejich ligandy zprostředkovávají silnou relaxaci podélně orientovaných děložních svazků. Farmakologická využitelnost těchto zjištění však není v současné době jasná¹⁵.

Významná souvislost mezi léčbou cinakalcetem a zpomalením úbytku minerální kostní denzity byla prokázána u pacientů se sekundární hyperparatyreózou, což opět naznačuje klinický přínos této skupiny látek¹⁶. Objev kalcimimetik s rozdílnými účinky na sekreci PTH a kalcitoninu byl popsán Henleyem a spol.¹⁷. Posledně uvedení autoři vyvinuli kalcimimetikum novější generace, u kterého stanovili molekulárně-farmakologické vlastnosti pomocí modelu allosterické modulace / agonismu, dále změřili účinky této látky na sérové hladiny PTH, ionizovaného Ca^{2+} a kalcitoninu u nefrektomovaných potkanů a nakonec zjistili, že tato nová molekula účinně snižuje hladinu PTH bez propagace sekrece kalcitoninu nebo hypokalcémie. Autoři tak podali důkaz, že kalcimimetika se zvýšenou účinností mohou být použita ke snížení PTH bez produkce významné hypokalcémie, protože práh pro inhibici sekrece PTH je mnohem nižší, než je prahová hodnota pro sekreci kalcitoninu.

2.3. Allosterické aktivátory sirtuinu 1: resveratrol a příbuzné látky

Farmakologické strategie využívající allosterické mechanismy k modulaci sirtuinů látkami o malé molekule dosahují stále většího pokroku v oblasti lidského výzkumu při snaze nalézt potenciální klinické uplatnění¹⁸. Značná kapacita využití v různých lékařských oborech je přisuzována přirozeně se vyskytujícím cytoprotektivním látkám, jako je resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilben), a dalším příbuzným látkám přírodního (např. kvercetin) nebo syntetického (např. SRT1720) původu s podobnými molekulárními mechanismy působení a fyziologickými účinky. Resveratrol byl nedávno charakterizován mimo jiné jako aktivátor sirtuinu 1 nebo-li SIRT1 („silent information regulator T1“), který zvyšuje fosforylaci AMP-aktivované protein kinasy (AMPK) a snižuje biomarkery oxidativního poškození v průběhu stárnutí za laboratorních podmínek. SIRT1 jako NAD^+ -dependentní proteinová deacetylase také katalyzuje odstranění acetylové skupiny z N^{ϵ} atomu aminokyseliny lysinu. Významná je především deacetylase histonů sirtuinem 1 vedoucí k epigenetické represí a umlčení („silencing“) genové transkripce.

Zprávy o resveratrolu a dalších aktivátorech SIRT1 z různých zdrojů jsou velmi povzbudivé. Proto se biomedicínský výzkum využívající metody aktivace / inhibice sirtuinů malými molekulami prostřednictvím allosterických mechanismů velmi rychle rozvíjí. Horečná aktivita v této oblasti výzkumu je podporována nadějí, že tyto látky pomohou vyléčit řadu metabolických onemocnění a zastavit stárnutí. Zdá se, že resveratrol a resveratrolu podobné molekuly skutečně naplní požadavky kladené na výzkum léčiv v nové perspektivě, jelikož tyto molekuly

nabývají stále na důležitosti jako výzkumné prostředky ve smyslu funkce antioxidantů s allosterickým mechanismem působení zaměřeným na epigenetické lékové cíle. Přesto je nutné zmínit, že zde neustále existují problémy spojené s extrapolací výsledků základního výzkumu do klinické praxe. Nicméně otázka sirtuinů v biologii a nemoci nabízí nový pohled na terapeutický potenciál léčiv, jejichž účinnost je založena na modulaci aktivity sirtuinů, a dokládá obrovskou složitost použití léčiv cílených na tyto struktury u člověka.

3. Závěr

Proces zkoumání a využívání allostérie v oblasti vývoje a designu léčiv představuje nový horizont při vyhledávání nových skupin léků. Příklady uvedené výše, dokládající skutečné úspěchy klinického používání, představují významný krok směrem k potenciálnímu objevu selektivnějších terapeutik s předpokládaným nižším výskytem nežádoucích účinků.

Tato práce vznikla za podpory institucionálního programu PRVOUK-P25/LF1/2.

Seznam zkratk

AMPK	adenosin-5'-monofosfátem aktivovaná proteinová kinasa
BZ	benzodiazepiny
BZR	benzodiazepinový receptor
CaR	„calcium sensing receptor“ – povrchový receptor pro kalcium
GABA	gamma-aminomáselná kyselina
GABA _A -R	typ A receptoru pro gamma-aminomáselnou kyselinu
GPCR	membránové receptory spřažené s G proteiny
NAD ⁺	nikotinamidadenin dinukleotid – oxidovaná forma NAD
PTH	parathormon
SIRT1	„silent information regulator T1“ – sirtuin 1

LITERATURA

1. Monod J., Wyman J., Changeux J.P.: *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965).
2. Peracchi A., Mozzarelli A.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1814, 922 (2011).
3. Monod J., Jacob F.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 389 (1961).
4. Schwartz T. W., Holst B.: *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 366 (2007).
5. Kenakin T. P.: *J. Biomol. Screen.* 15, 119 (2010).

6. Panjkovich A., Daura X.: *BMC Struct. Biol.* 10, 9 (2010).
7. Zorn J. A., Wells J. A.: *Nat. Chem. Biol.* 6, 179 (2010).
8. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. (ed.): *Pharmacology*, 7. vydání, str. 452. Churchill Livingstone, 2012.
9. Trincavelli M. L., Da Pozzo E., Daniele S., Martini C.: *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 254 (2012).
10. Jensen A. A., Bräuner-Osborne H.: *Curr. Neuropharmacol.* 5, 180 (2007).
11. Trivedi R., Mithal A., Chattopadhyay N.: *Curr. Med. Chem.* 15, 178 (2008).
12. Ward D. T., Riccardi D.: *Br. J. Pharmacol.* 165, 35 (2012).
13. Davey A. E., Leach K., Valant C., Conigrave A. D., Sexton P. M., Christopoulos A.: *Endocrinology* 153, 1232 (2012).
14. Cavanaugh A., Huang Y., Breitwieser G. E.: *Br. J. Pharmacol.* 165, 1670 (2012).
15. Pistilli M. J., Petrik J. J., Holloway A. C., Crankshaw D. J.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 37 (2012).
16. Ishimura E., Okuno S., Tsuboniwa N., Ichii M., Yamakawa K., Yamakawa T., Shoji S., Nishizawa Y., Inaba M.: *Clin. Nephrol.* 76, 259 (2011).
17. Henley C. 3rd, Yang Y., Davis J., Lu J. Y., Morony S., Fan W., Florio M., Sun B., Shatzken E., Pretorius J. K., Richards W. G., St Jean D. J. Jr, Fotsch C., Reagan J. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337, 681 (2011).
18. Kutinová Canová N., Gaier N., Farghali H.: *Cas. Lek. Cesk.* 151, 187 (2012).

H. Farghali and N. Kutinová Canová (*Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Allosteric Binding Sites as Molecular Targets in Development, Design and Action of Drugs**

Widespread occurrence of allostery has been recently exploited for design and development of drugs that bind to physiological or non-physiological allosteric sites. This may lead to gain or loss of function. Allostery can be exploited in development and design of allosteric drugs. Benzodiazepines are classical examples of allosteric agonists for the GABA_A receptor complex, where the neurotransmitter 4-aminobutanoic acid (GABA) binds to the active site and benzodiazepines bind to the regulatory site. The allosteric modulation of the Ca-sensing receptor with important clinical consequences has been described. Some of calcimimetics such as cinacalcet were approved for the treatment of certain forms of hyperparathyroidism. Allosteric modulators of regulatory target proteins such as sirtuin 1 are intensively investigated.