

Historical milestones

1901, Langley and Dale: idea of a “receptive substance” on reactive cells

Beginning '900, Ariens, Furchgott, Schild, Blake: studies on animal models, isolated organs and tissues to investigate the role of neurotransmitters, peptides, and drugs.

The target for most of these molecules later turned up to be GPCRs.

Definitions of agonist, antagonist, affinity, efficacy, potency, etc

Developed of methods to analyze dose response curves

1970s: Radioligand binding studies

receptors as concepts

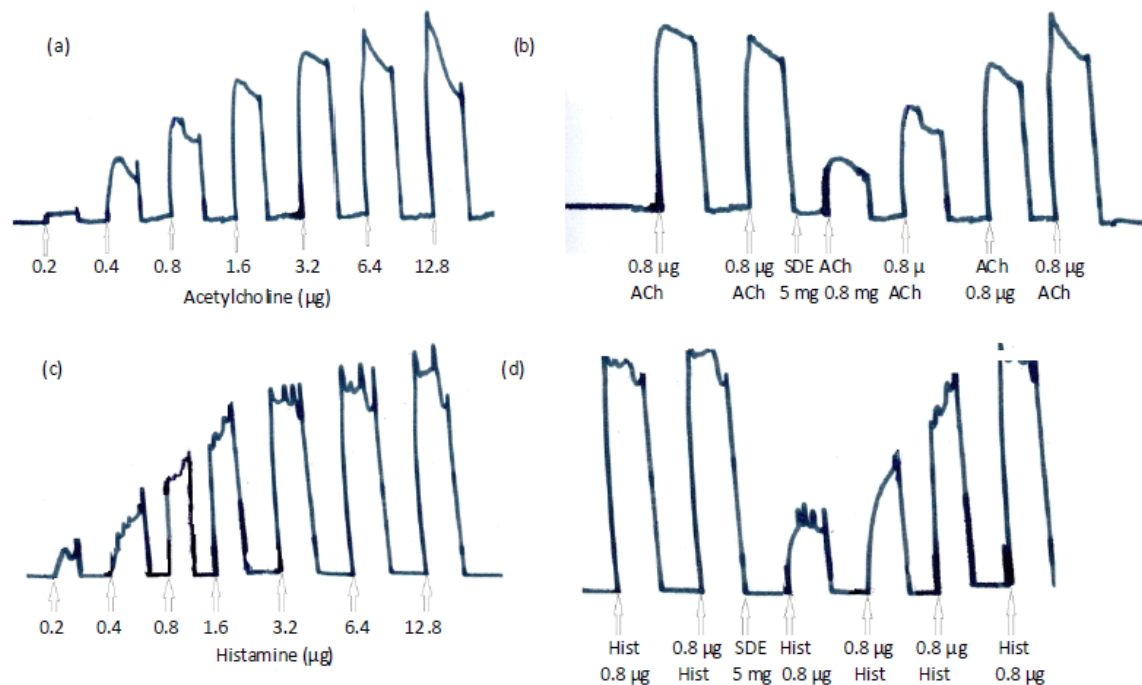
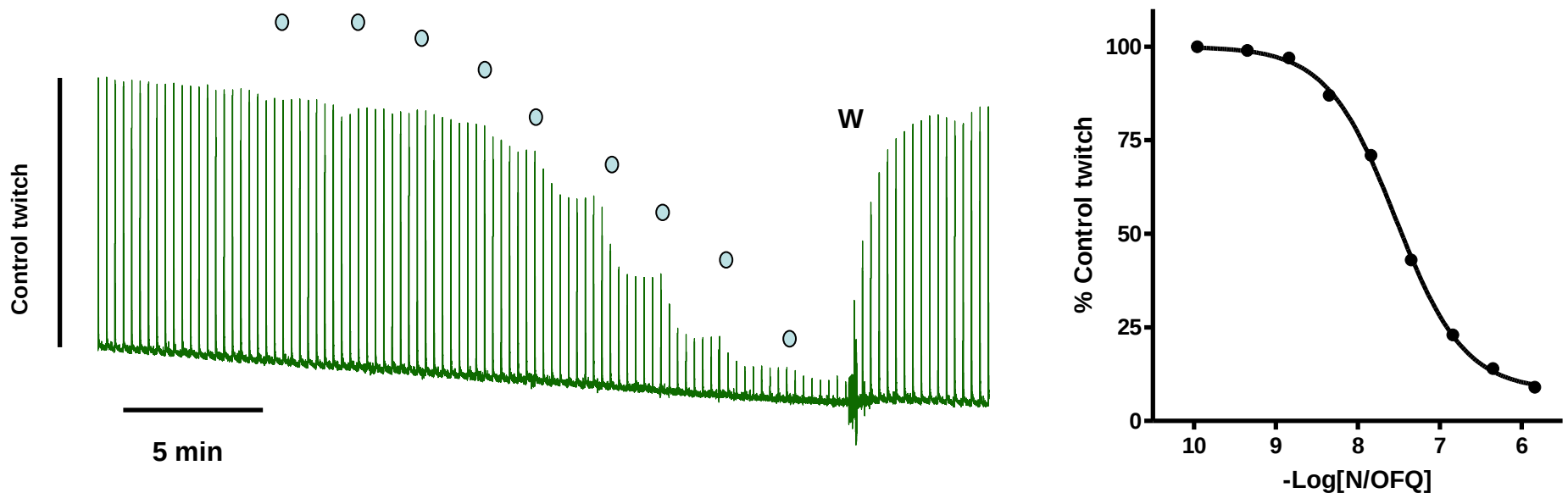


Fig. 5(a-d): Dose response tracing for (a) Acetylcholine (b) It's respective antagonism by SDE (c) Histamine and (d) It's respective antagonism by SDE

receptors as concepts

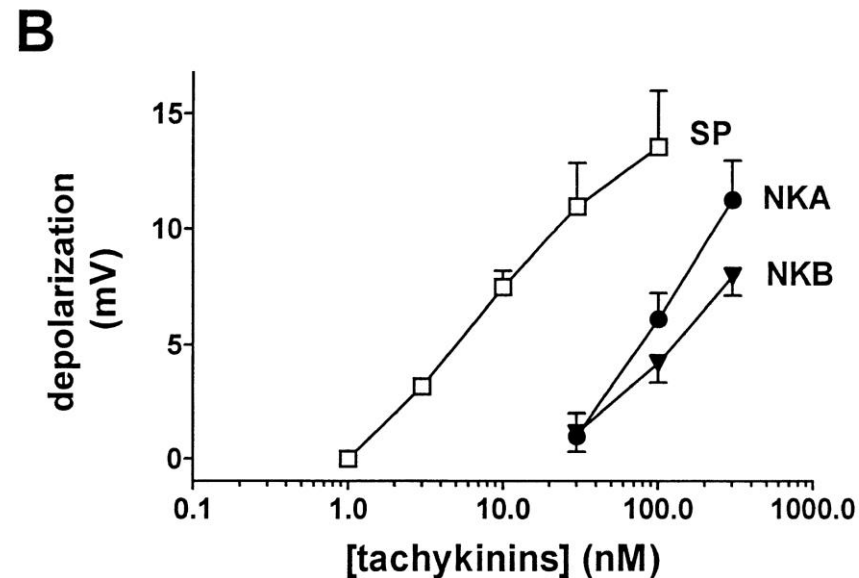
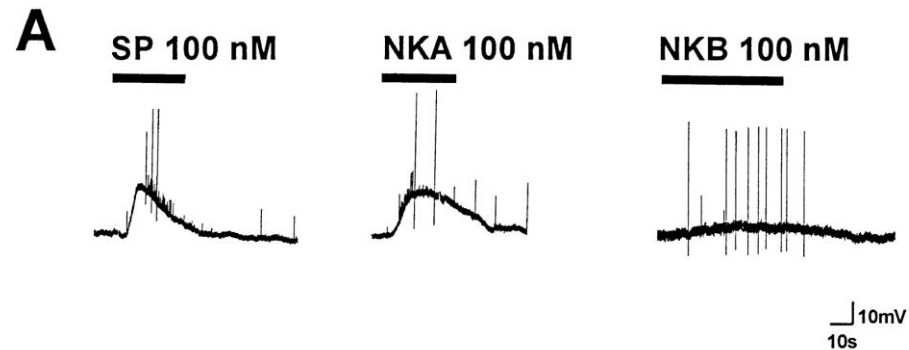
Single representative experiment of the concentration-response curve to N/OFQ



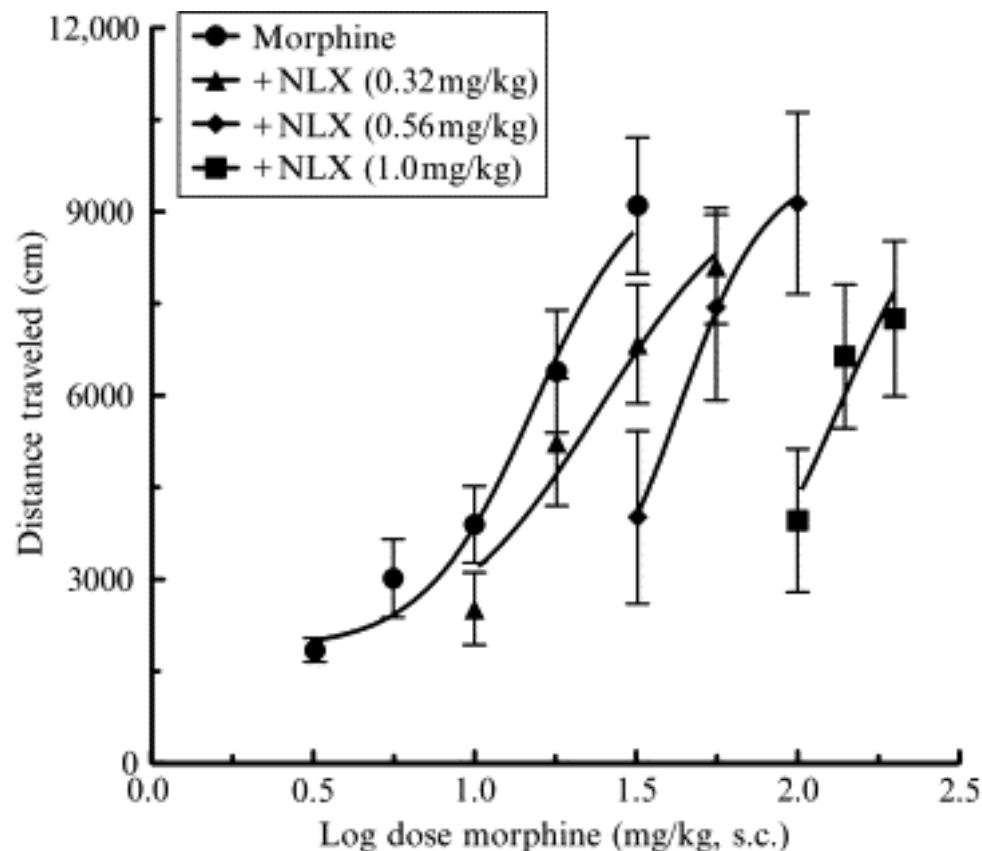
Concentration-response curves to agonists and inhibition response curves to antagonists were analyzed with a four-parameter logistic nonlinear regression model:

$$\text{Effect} = \text{Baseline} + (\text{E}_{\text{max}} - \text{Baseline}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - \text{Log}[\text{ligand}]) \text{Slope}))})$$

receptors as concepts



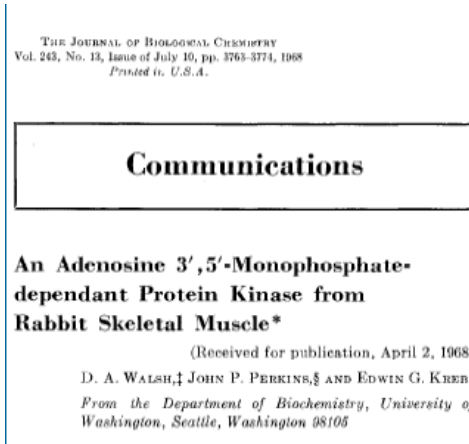
receptors as concepts (in vivo)



'60 - '70: elements of the signaling cascade

1950-'60, Sutherland: discovery of cAMP

1968, Krebs: discovery of protein kinase A



1971, Rodbell: proposed the existence of guanine nucleotide regulatory protein that serves as a transducer between hormone receptors and adenylyl cyclase

The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver

IV. EFFECTS OF GUANYL NUCLEOTIDES ON BINDING OF ¹²⁵I-GLUCAGON

(Received for publication, October 7, 1970)

MARTIN RODBELL, H. MICHEL J. KRANS,* STEPHEN L. POHL, AND LUTZ BERNBAUMER

*From the Section on Membrane Regulation, Laboratory of Nutrition and Endocrinology, National Institute of
Arthritis and Metabolic Diseases, Bethesda, Maryland 20014*

1971, Gilman: demonstrated the existence of that protein, purified the protein and named it Gs

Resolution of Some Components of Adenylate Cyclase Necessary for Catalytic Activity*

(Received for publication, August 6, 1977)

ELLIOTT M. ROSE AND ALFRED G. GILMAN†

*From the Department of Pharmacology, University of
Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia
22903*

G Proteins: Transducers of Receptor- Generated Signals

A G Gilman

Annual Review of Biochemistry, July 1987,
Vol. 56, Pages 615-649

(doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151)

'80 - '90: molecular era of receptor research

1979, Lefkowitz : β_2 -adrenoceptor purification

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 254, No. 8, Issue of April 25, pp. 2013-2017, 1979
Printed in U.S.A.

Affinity Chromatography of the β -Adrenergic Receptor*

(Received for publication, September 28, 1978)

Marc G. Caron,[‡] Yogambal Srinivasan, Josef Pitha,[§] Karol Kociolek,[§] and Robert J. Lefkowitz[¶]

From the Departments of Medicine and Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710, the [§]Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Gerontology Research Center, National Institute on Aging, National Institutes of Health, United States Public Health Service, Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda, Maryland 20205, and the Baltimore City Hospitals, Baltimore, Maryland 21224

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 80, pp. 4899-4903, August 1983
Biochemistry

Reconstitution of β -adrenergic receptors in lipid vesicles: Affinity chromatography-purified receptors confer catecholamine responsiveness on a heterologous adenylate cyclase system

(octyl glucoside/Sepharose-alprenolol)

RICHARD A. CERIONE*, BERIA SIRULOVICI*, JEFFREY L. BENOVIC[†], CATHERINE D. STRADER*, MARC G. CARON^{*†}, AND ROBERT J. LEFKOWITZ^{*‡}

Howard Hughes Medical Institute, Departments of *Medicine (Cardiology), [†]Biochemistry, and [‡]Physiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710

Communicated by Henry A. Lardy, May 2, 1983

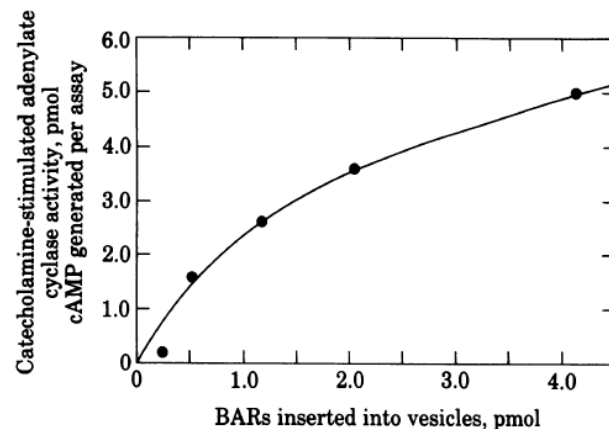


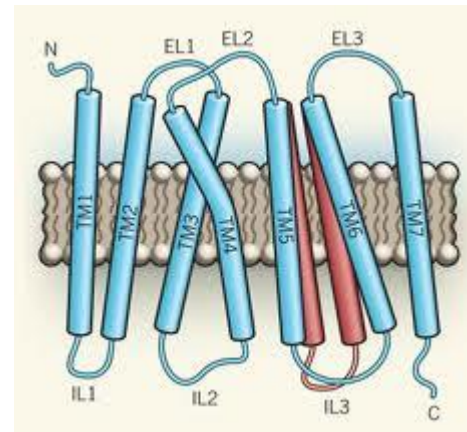
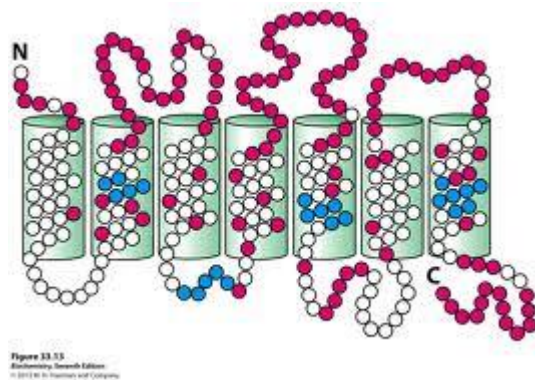
FIG. 4. Adenylate cyclase activity of *Xenopus* erythrocyte membranes as a function of the amount of reconstituted affinity chromatography-purified BAR added to the fusion system. The basal adenylate cyclase activity was 0.5–1 pmol per assay and was subtracted from each point. The data represent triplicate determinations and are representative of two experiments.

1982, Lefkowitz & Merck's researchers: β_2 -adrenoceptor cloning → homology to bovine rhodopsin sequence → speculation on the presence of a large genetic family of such receptors
GPCR - 7TM

This concept was confirmed when other GPCR were cloned: ACh_R, 5-HT_R (Hall, 1987) and sub. K receptor (Masu, 1987)

Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin

Richard A. F. Dixon^{}, Brian K. Kobilka[†], David J. Strader[‡], Jeffrey L. Benovic[†], Henrik G. Dohlman[†], Thomas Frielle[†], Mark A. Bolanowski[†], Carl D. Bennett[§], Elaine Rands^{*}, Ronald E. Diehl^{*}, Richard A. Mumford[‡], Eve E. Slater[‡], Irving S. Sigal^{*}, Marc G. Caron[†], Robert J. Lefkowitz[†] & Catherine D. Strader[‡]*



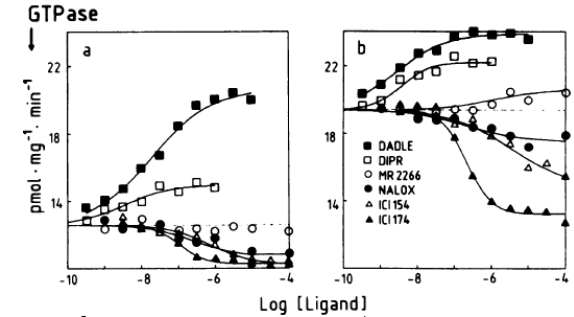
1989, Costa and Herz: discovery of the phenomenon of inverse agonism and hypothesis of receptor constitutive activity

Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins

(guanine nucleotide-binding regulatory proteins/GTPase/ternary complex)

TOMMASO COSTA* AND ALBERT HERZ

Department of Neuropharmacology, Max-Planck-Institut fuer Psychiatrie, Am Klopferspitz 18a, Martinsried, Federal Republic of Germany



1990s mutagenesis studies to understand structural features that determine receptor function

ligand binding domain and intracellular domain interacting with G proteins were determined

1992, Cotecchia discovery of constitutively activated mutant receptors

→ nucleic acid-based homology screening approaches could be applied to found new GPCRs

'90s: **orphan receptors** and **reverse pharmacology**

2001: elucidation of human genome improved reverse pharmacology

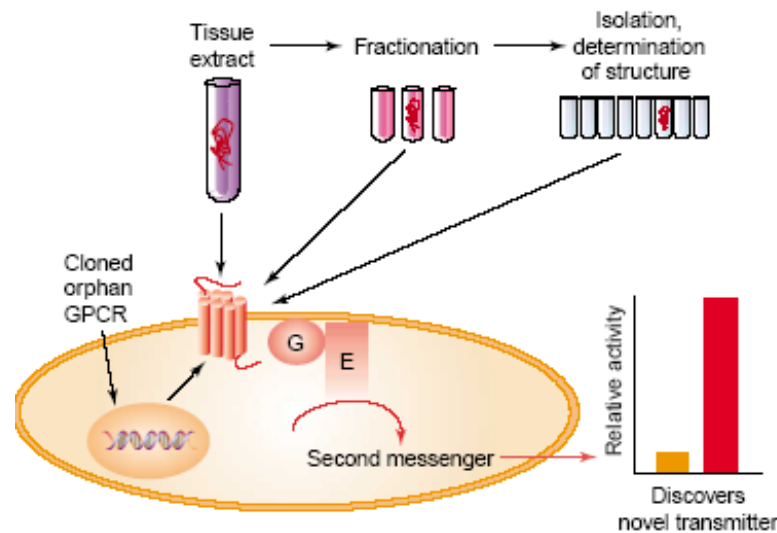
The first successful example of reverse pharmacology

1992-93: Cloning of classical opioid receptors sequences

Evans et al., 1992
Cheng et al., 1993
Yasuda et al., 1993

1994: Cloning of an opioid like receptor

Mollereau et al., 1994
Wang et al., 1994
Fukuda et al., 1994
Bunzow et al., 1994
Nishi et al., 1994



1995: identification of the natural ligand

Meunier et al., *Nature*, 1995
Reinschied et al., *Science*, 1995

Opioid receptor-like 1 (NOP)

- ✓ GPCR
- ✓ High structural homology with classical opioid receptors
- ✓ No affinity for opioid ligands

Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ)

FGGFTGARKSARKLANQ

- ✓ High structural homology with dynorphin A
- ✓ No affinity for opioid receptors

DEORPHANIZATION STRATEGIES

FLIPR ($\uparrow \text{Ca}^{2+}$)

To direct the signaling via PLC the receptors are expressed in cells in the presence of a cocktail of G protein ($G_{q15/16}$; chimeric protein G_{qi} and G_{qs})

Ex: UT, NPS_R

GPCR can be expressed in **yeast**. The receptor activation is linked to the expression of a reporter gene (β -galactosidase)

Ex: GPR119 - oleylethanolamide

GPCR can be expressed in ***Xenopus cells***. If the receptor coupled with G_s or G_q its activation causes a darkening of the cell; If the receptor coupled with G_i its activation causes a lightening of the cell

Ex: GPRC6A – L-aminoacids with preference for basic Aa

REVERSE PHARMACOLOGY PRODUCTS

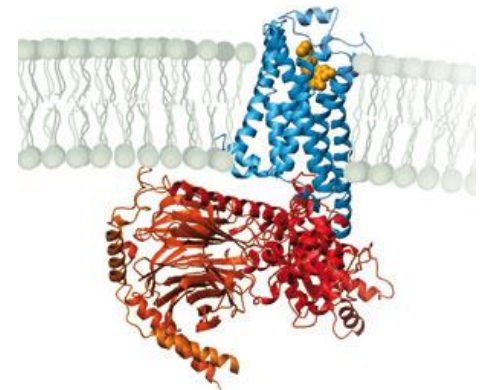
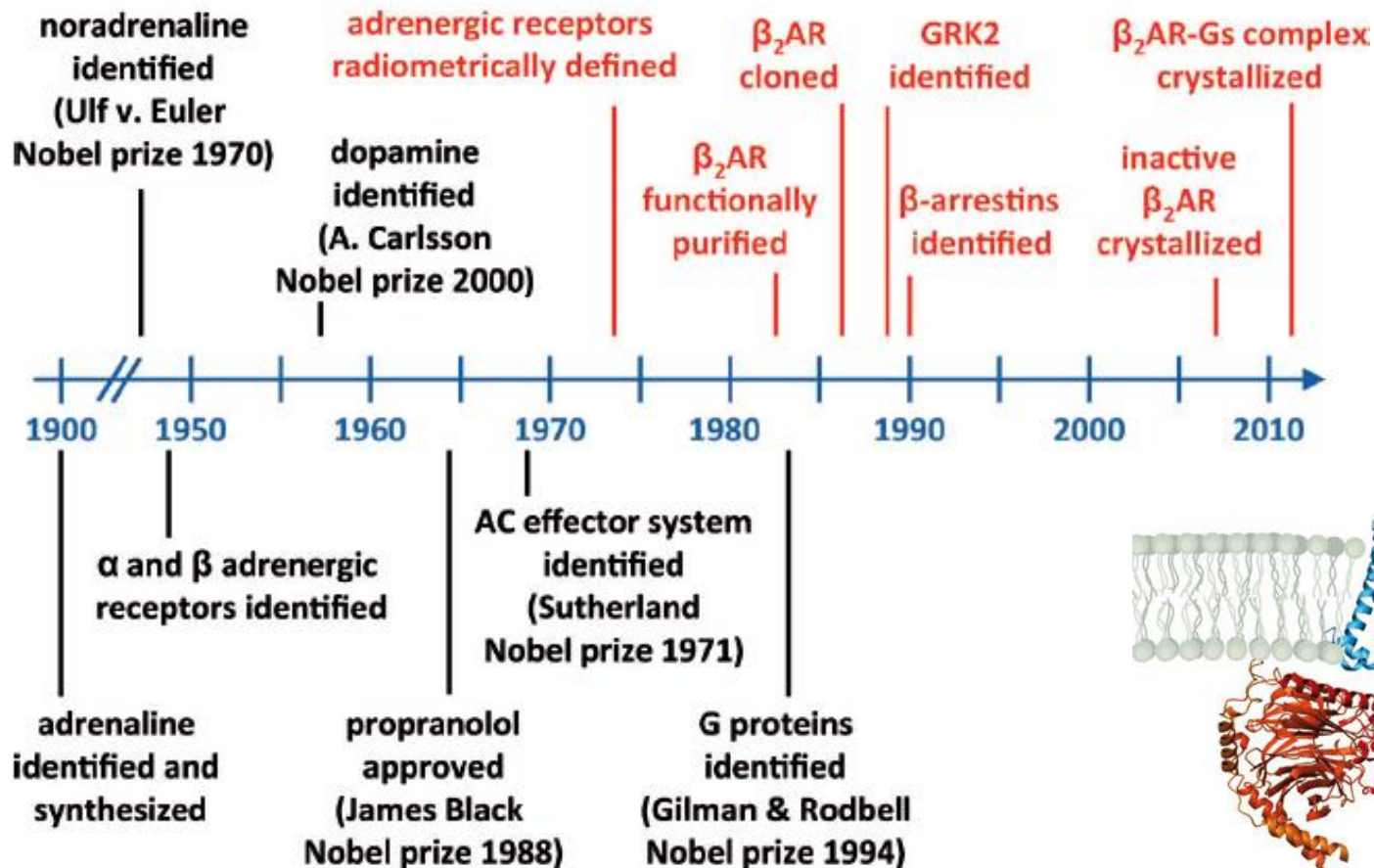
Table 1. The transmitters identifies as ligands of orphan GPCRs after 1995^a

Date	Transmitters found ^b	
	By synthetic ligand binding	In tissue extracts
1995	–	N/OFG
1996	C3a	–
1997	LTB ₄	–
	Latrotoxin	–
1998	S1P	Hypocretins and orexins
	LPA	PrRP
	–	Apelin
1999	LTD ₄	Ghrelin
	MCH	MCH
	Ull	Ull
	Motilin	–
2000	NMU	NMU
	UDP-glucose	–
	SPC	–
	LTB ₄	–
	Histamine	–
	Prostaglandin D ₂	–
	LTC ₄ and LTD ₄	–
	NPFF and NPAF	–
	hRFRP-1 and hRFRP-3	–
2001	LPC	Metastin
	SPC	–
	ADP	–
	Psychosine	–
	Trace amines	–
2002	5-Oxo-EET	NPB and NPW
	Bile acids	Adenine
	PK1 and PK2	PK1 and PK2
	BAM22	–
	Relaxin	–
2003	Bradykinin	Relaxin 3
	QRFP	–
	Cortistatin	–
	Medium and long fatty acids	–
	Nicotinic acid	–
	Proton	–
2004	β-Alanine	Succinate
	α-Ketoglutarate	NPS
	AMP and adenosine	–

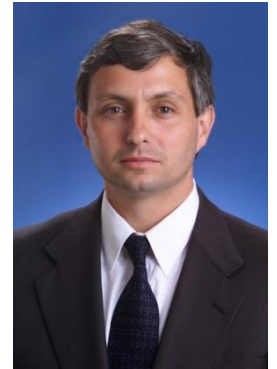
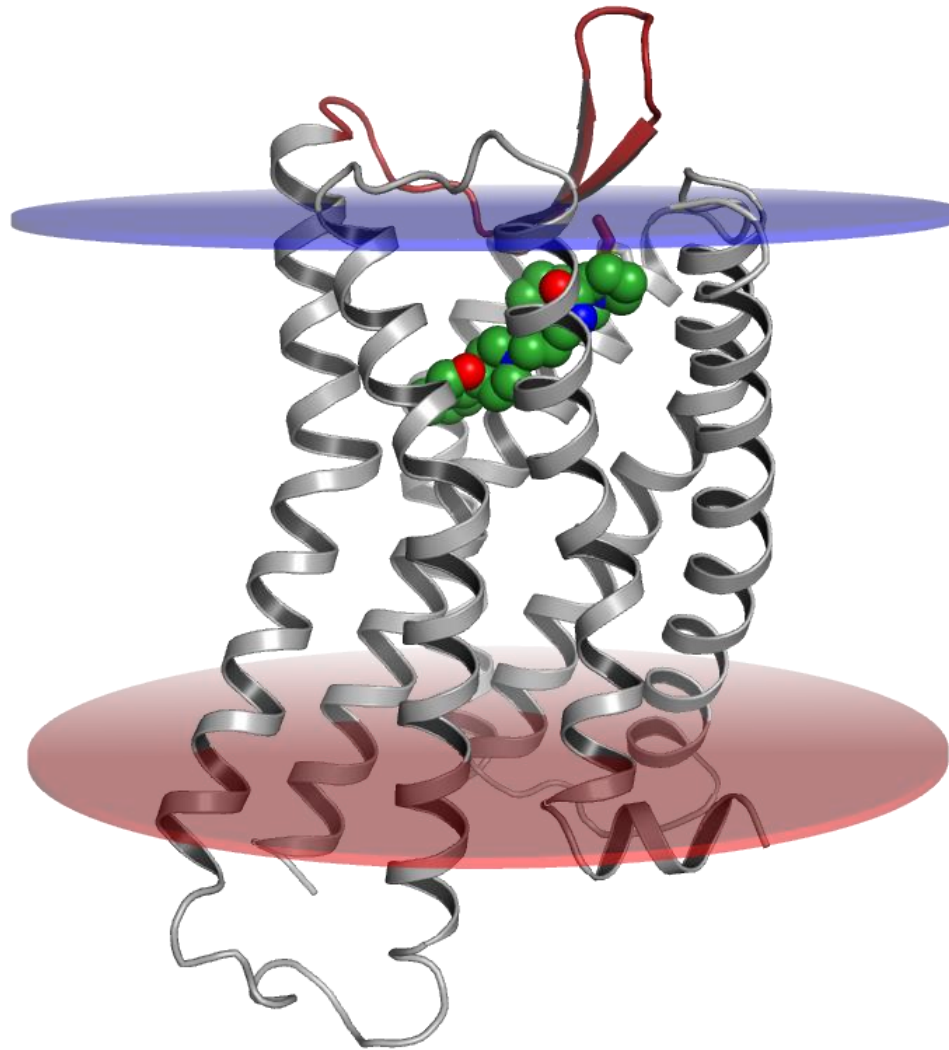
Deorphanized GPCRs reported to be in drug discovery

<i>Orphan receptor</i>	<i>Ligand</i>	<i>Therapeutic indication</i>	<i>Action of the compounds</i>	<i>References</i>
ORL-1 (NOP) Edg1, 3, 5, 6, 8 H3	Nociceptin/Orphanin FQ S1P Histamine	Stress and pain Autoimmune diseases Dementia	Agonist Agonist/antagonist Antagonist/inverse agonist	Shoblock (2007) Chiba (2005); Foss <i>et al.</i> (2007) Hancock (2006)
Orexin1, 2 SLC-1 (MCH1)	OrexinA and B MCH	Sleep disorders Obesity, anxiety and depression	Antagonist Antagonist	Bingham <i>et al.</i> (2006) McBriar (2006); Shimazaki <i>et al.</i> (2006)
GHSR GPR38	Ghrelin Motilin	Catabolic disorders Gastroparesis and irritable bowl syndrome	Agonist Agonist	Davenport <i>et al.</i> (2005) McCallum <i>et al.</i> (2007)
GPRv53 (H4) P2Y12 GPR16 (BLT1)	Histamine ADP LTB4	Inflammation Platelet aggregation Inflammation and rheumatoid arthritis	Antagonist Antagonist Antagonist	Dunford <i>et al.</i> (2007) van Giezen and Humphries (2005) Ding <i>et al.</i> (2005); Lundeen <i>et al.</i> (2006)
BLT2	LTB4	Inflammation and rheumatoid arthritis	Antagonist	Ding <i>et al.</i> (2005); Lundeen <i>et al.</i> (2006)
HG55 (CysLT1) GPR40	LTD4 Medium and long fatty acids	Bronchoconstriction Diabetes	Antagonist Agonist	Nayak (2004) Song <i>et al.</i> (2007)
HM74A, B	Nicotinic acid	Dyslipidaemia	Agonist	Offermanns (2006)

How do Receptors Work?



GPCR crystal structure



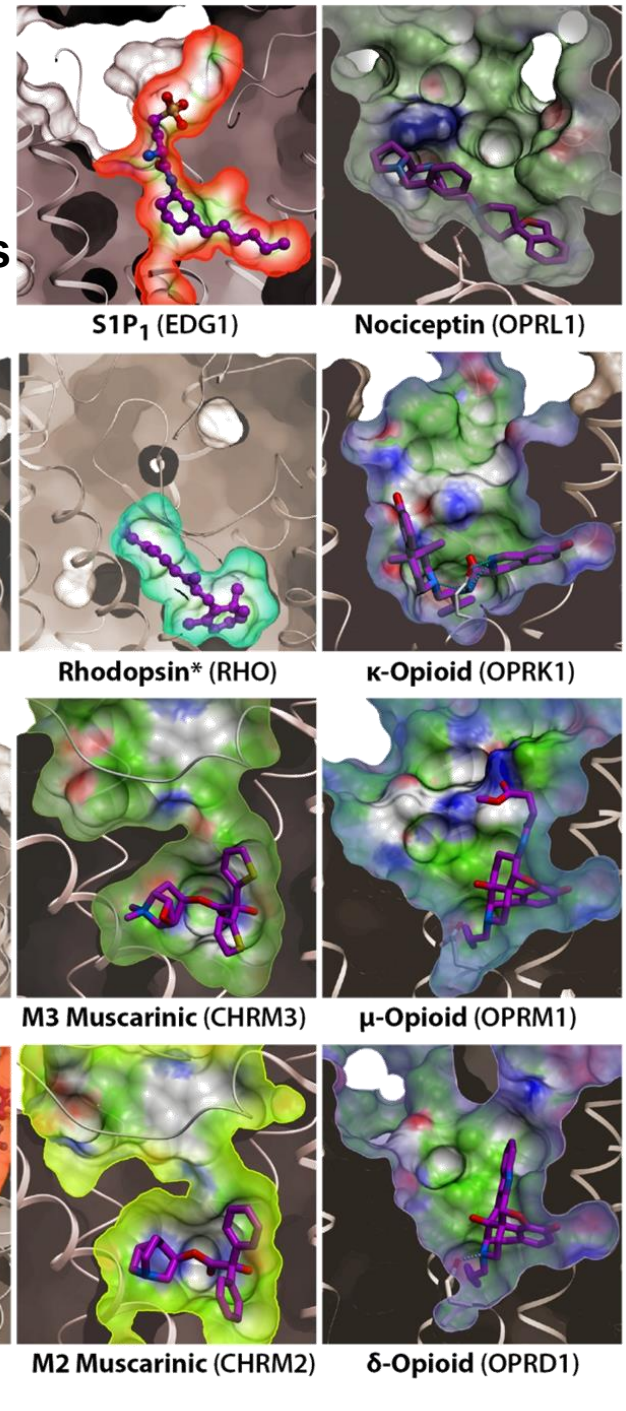
Stevens Lab GPCR Molecular Recognition

2007-2012 16 unique GPCR Structures
84 Co-ligand GPCR structures

Thousands of
Ligands -
Chemical
Diversity

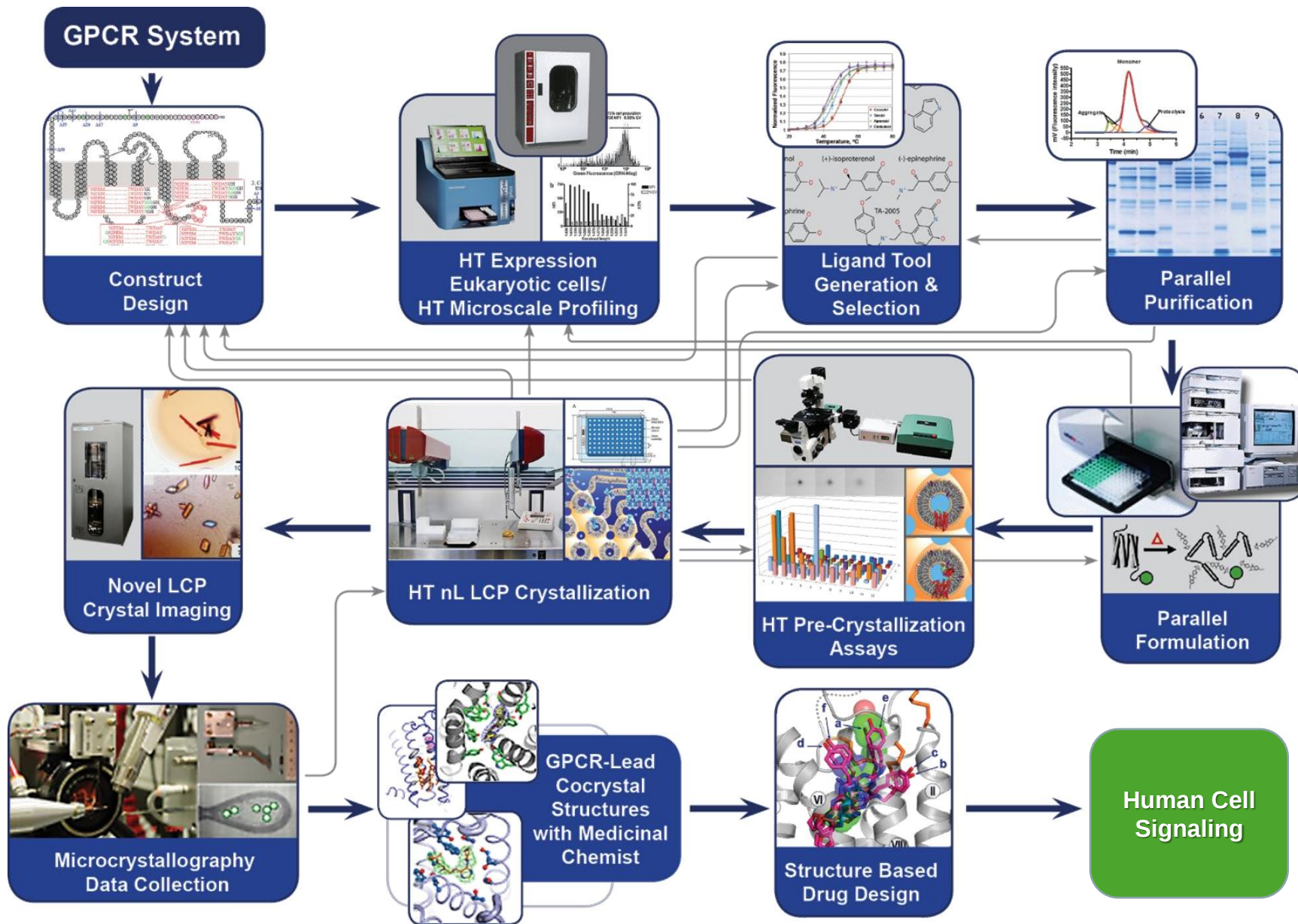
Hundreds of
Different
Human
Receptors
(largest family
in human genome)
Signaling
Mechanism/
Molecular
Recognition

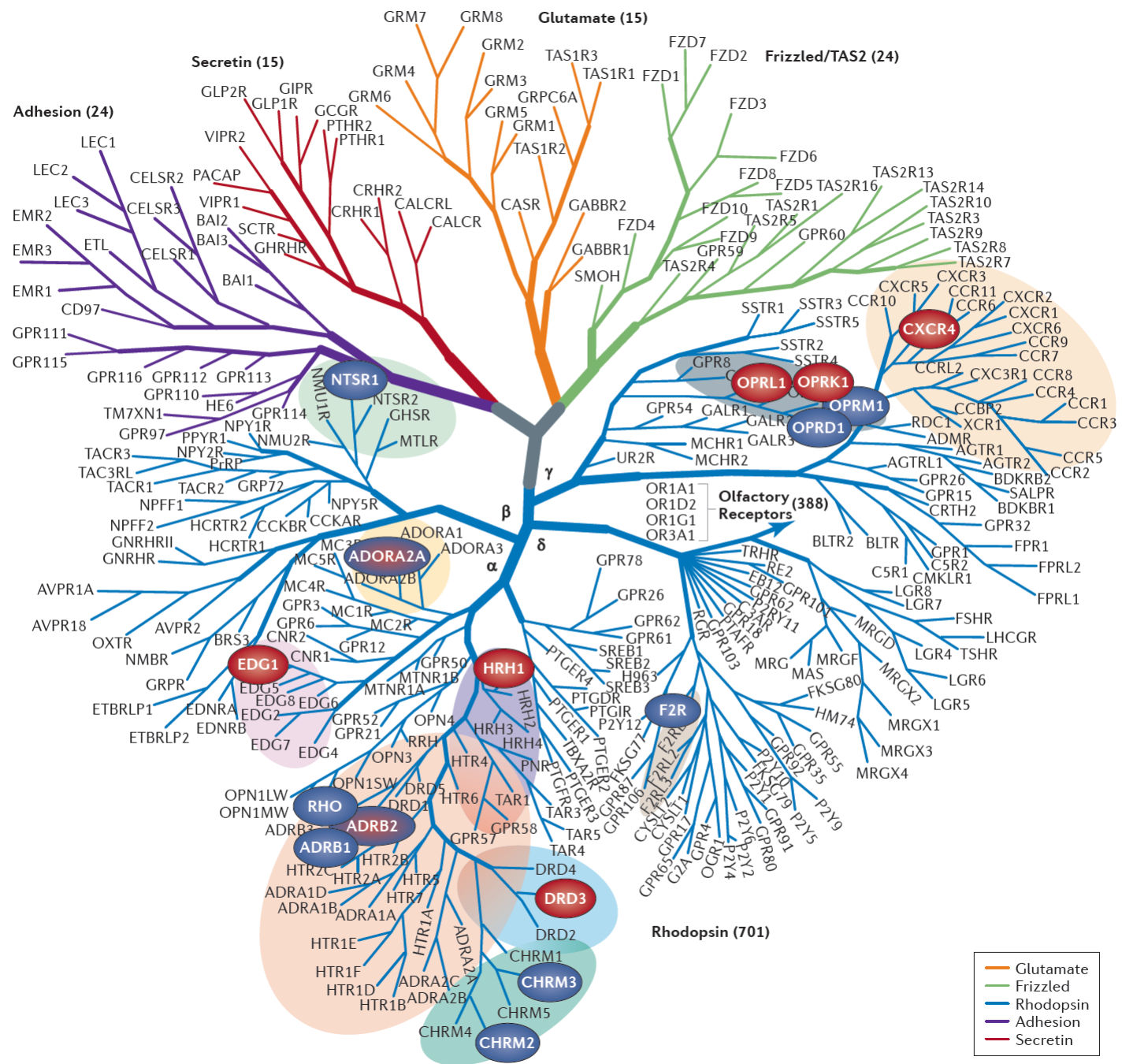
Dozens of
Effectors



*Both active (agonists) and inactive (antagonists) structures known

GPCR Structure-Function





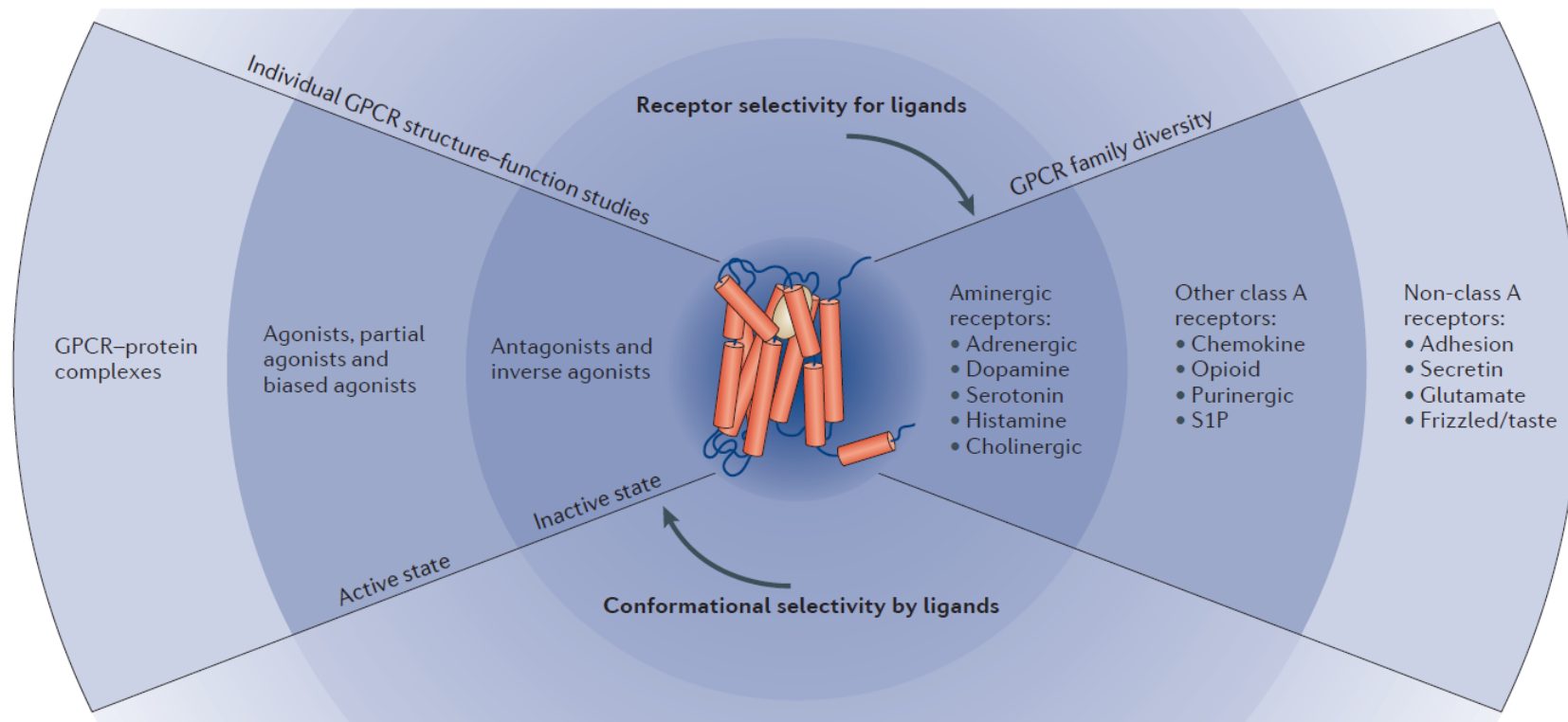
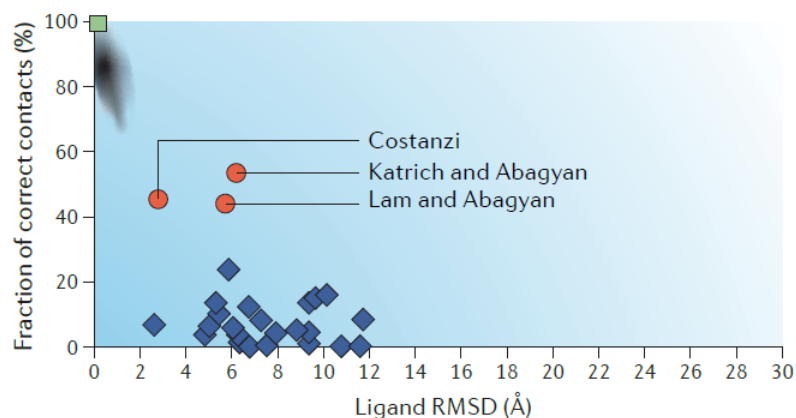


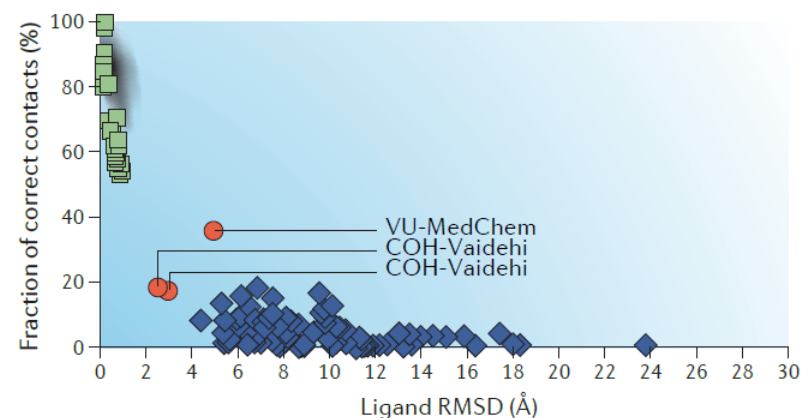
Figure 2 | The strategy of the GPCR Network. This schematic diagram demonstrates the strategy undertaken by the GPCR Network to determine receptor structure and function. It includes leveraging each experimentally determined receptor structure (for example, human β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR); centre) towards the understanding of G protein-coupled receptor (GPCR) family diversity and receptor selectivity for ligands (right

panel) as well as individual GPCR structure-function studies and conformational selectivity by ligands (left panel). By creating a complete data package for each receptor that includes complementary biophysical, structural, functional and ligand data, the receptors can be more thoroughly understood in contrast to just solving the structure with limited follow up. S1P, sphingosine-1-phosphate.

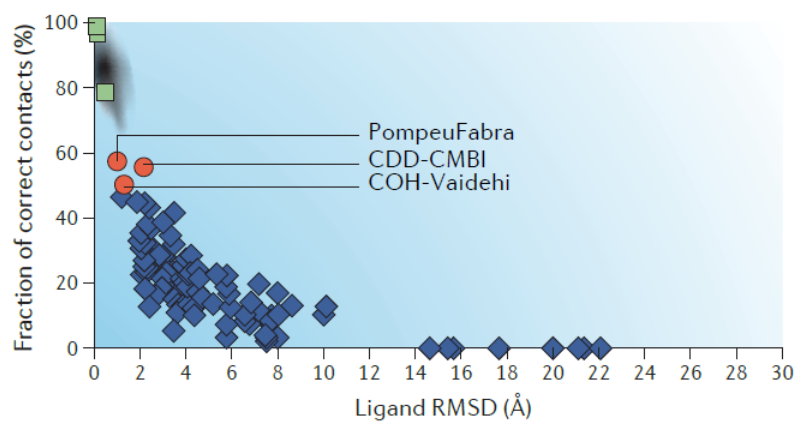
a Adenosine A_{2A} receptor–ZM241385 complex



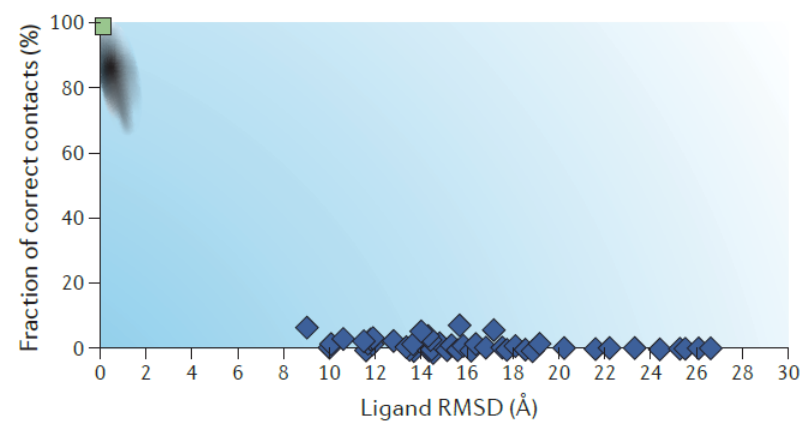
c CXCR4–IT1t complex



b Dopamine D₃–eticlopride complex

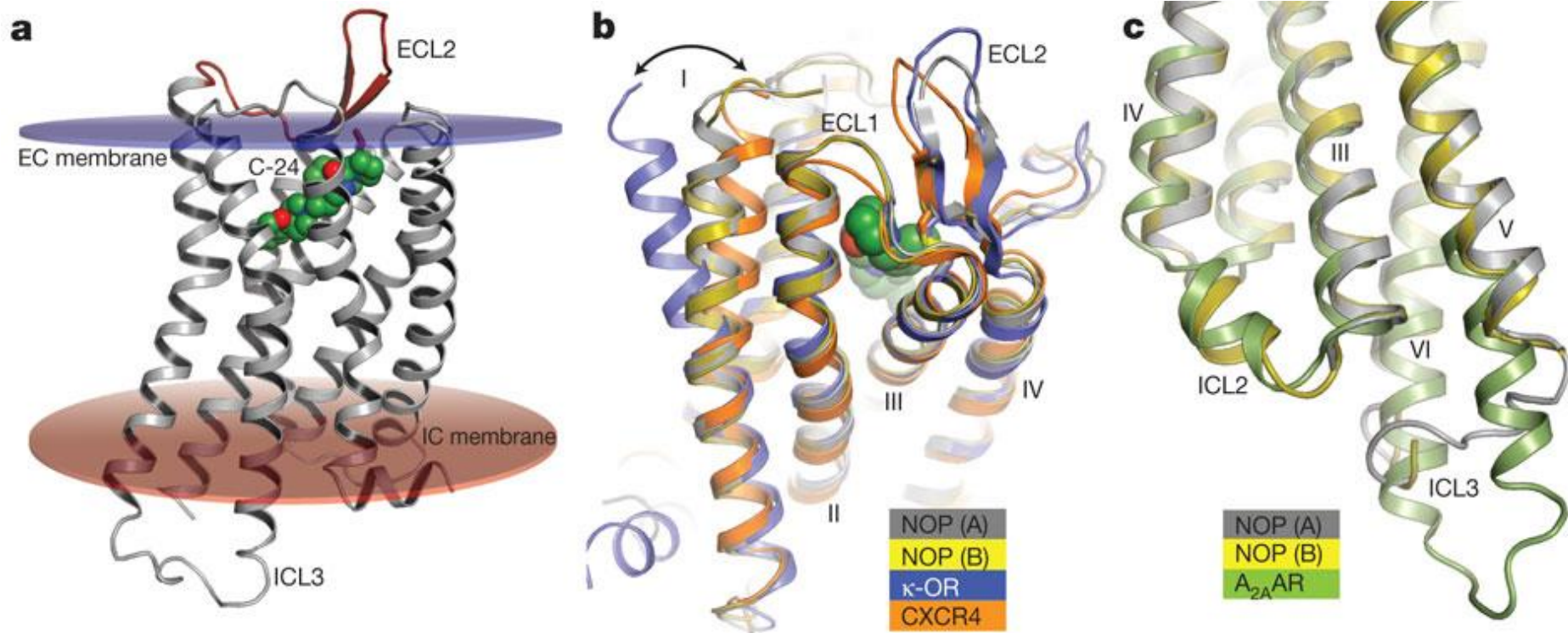


d CXCR4–CVX15 complex

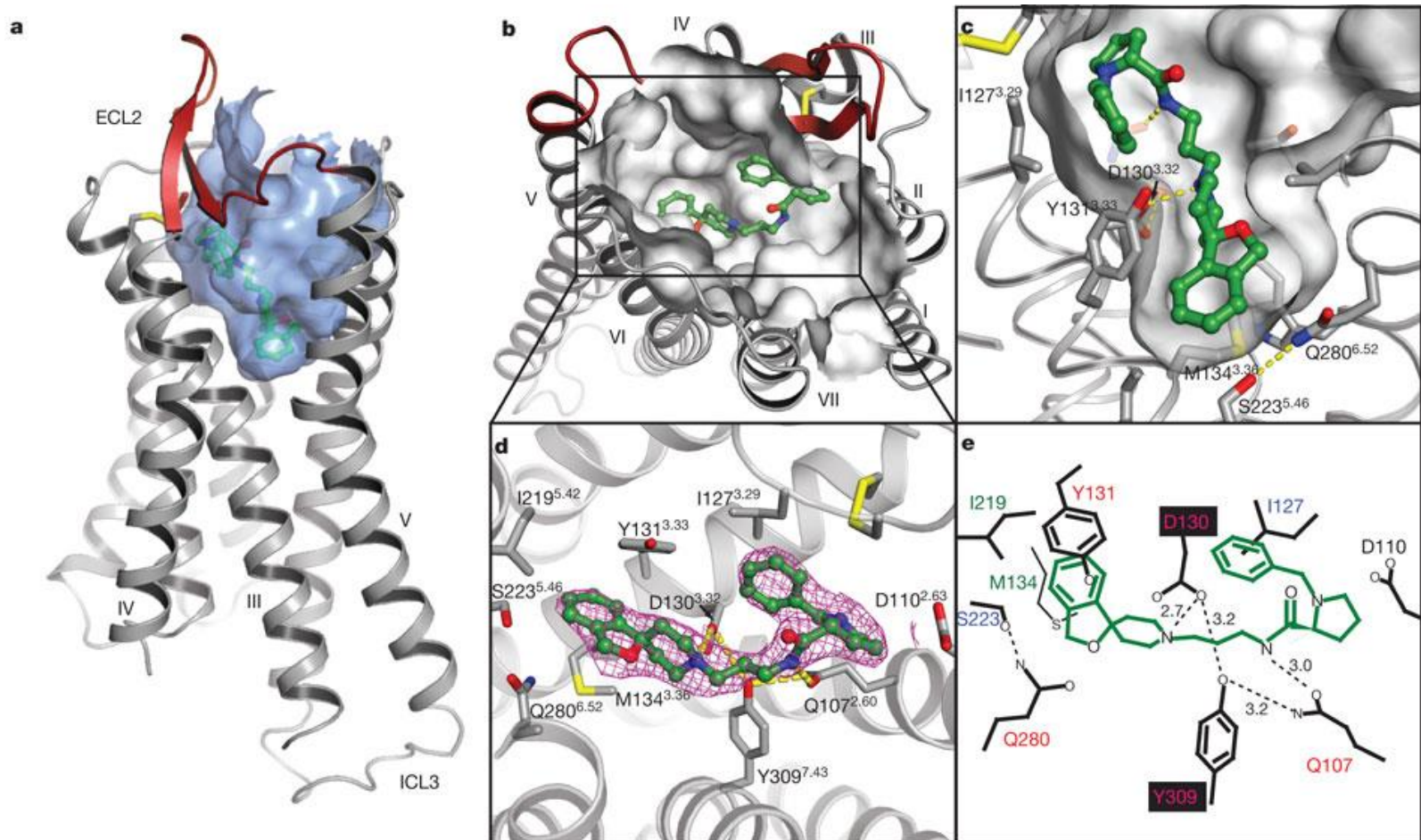


■ Experimentally determined structures ● Top-ranking models ◆ Predicted models

Structural overview of the NOP receptor

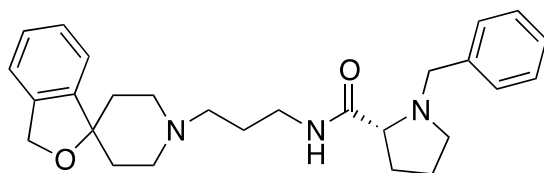


The orthosteric ligand-binding pocket

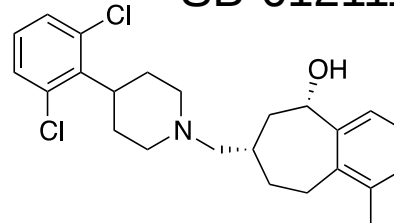


Structure of NOP receptor antagonists

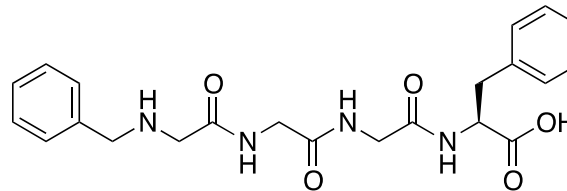
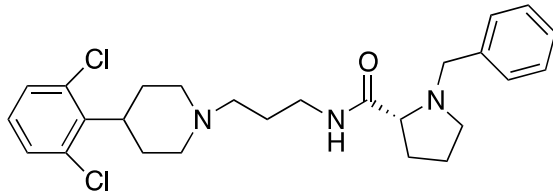
C-24



SB-612111

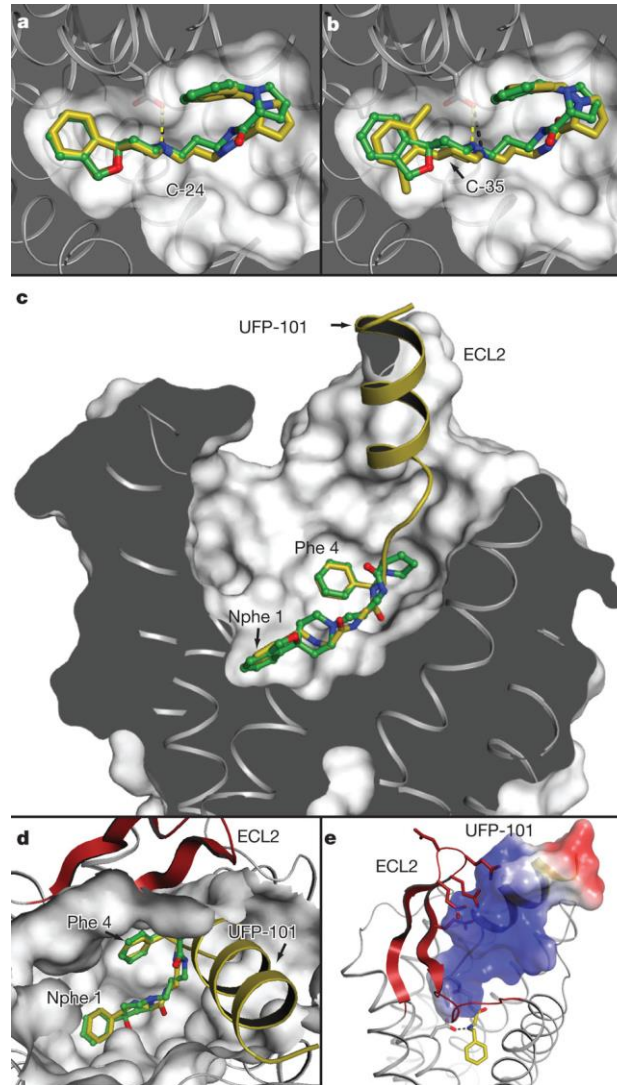


C-35

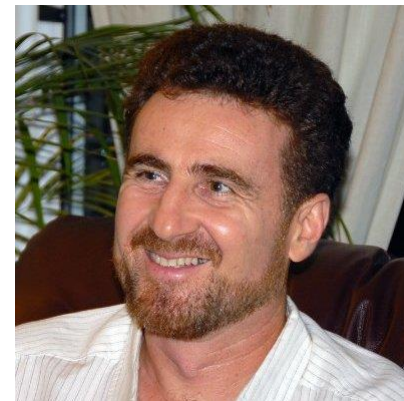
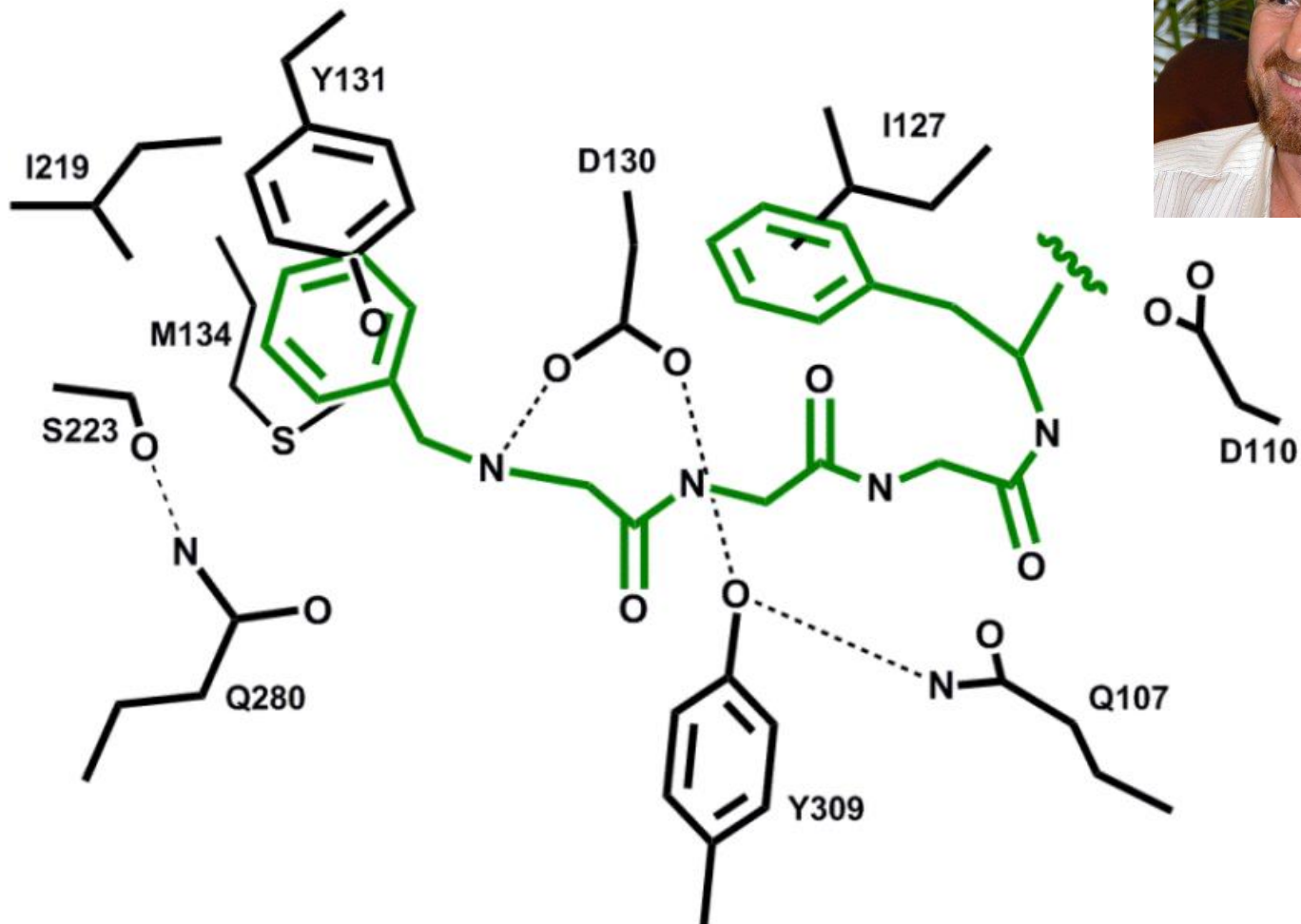


Tetra
Nphe

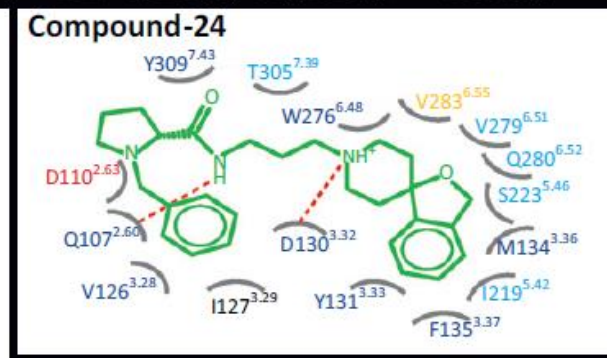
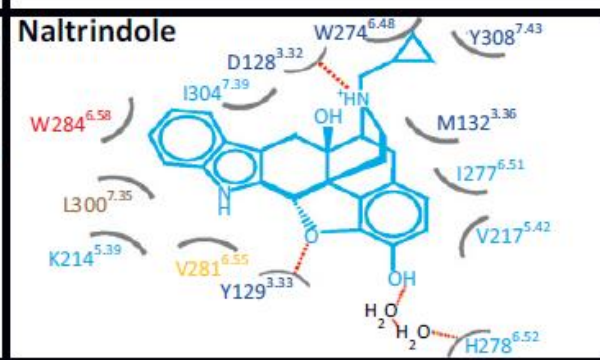
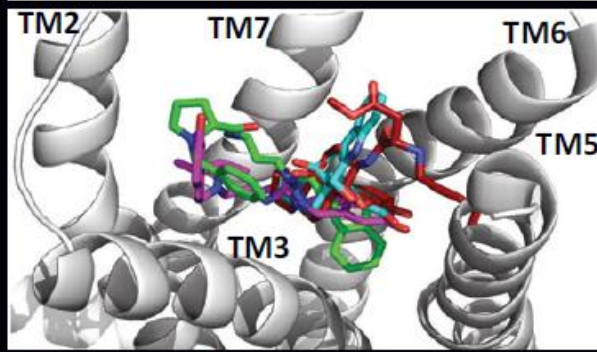
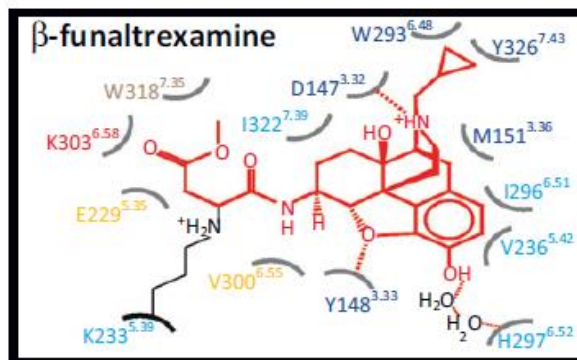
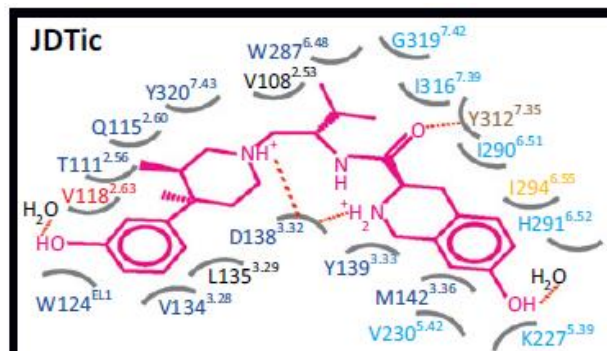
Molecular docking in the NOP orthosteric-binding pocket



UFP-101 / NOP receptor



NOP and classical opioid receptor structures

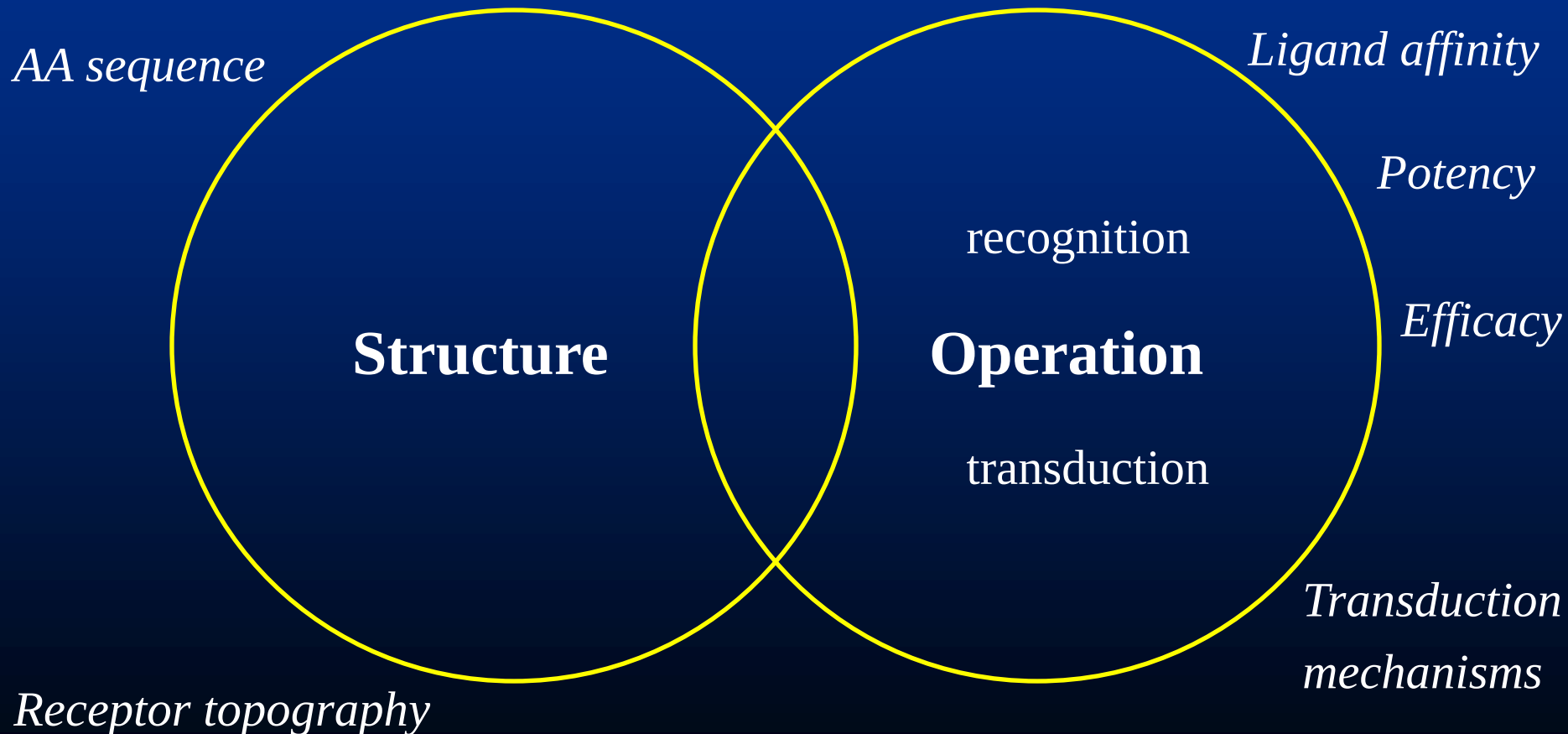


Meccanismi di Azione non recettoriali

- Proprieta' fisico/chimiche
- Enzimi
- Trasportatori
- Pompe
- etc

Receptor Characterization

The integrated approach towards receptor characterization

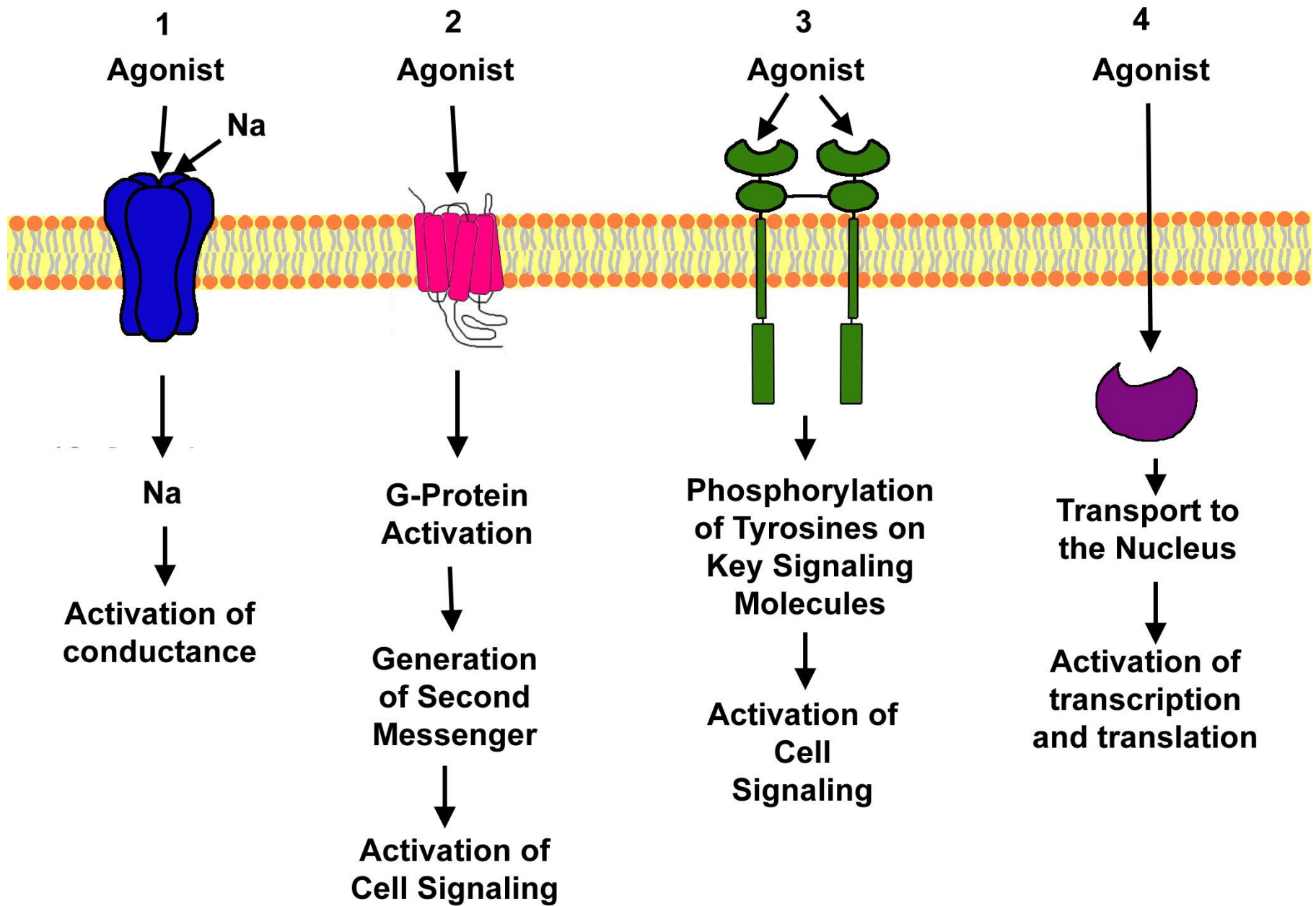


Receptor Class Code

Code

Structural Class

1.0	Ion-channel receptors
2.0	7TM - GPCR
3.0	Enzyme-associated receptors
4.0	Transcriptional regulator receptors



GRAC & NC IUPAR

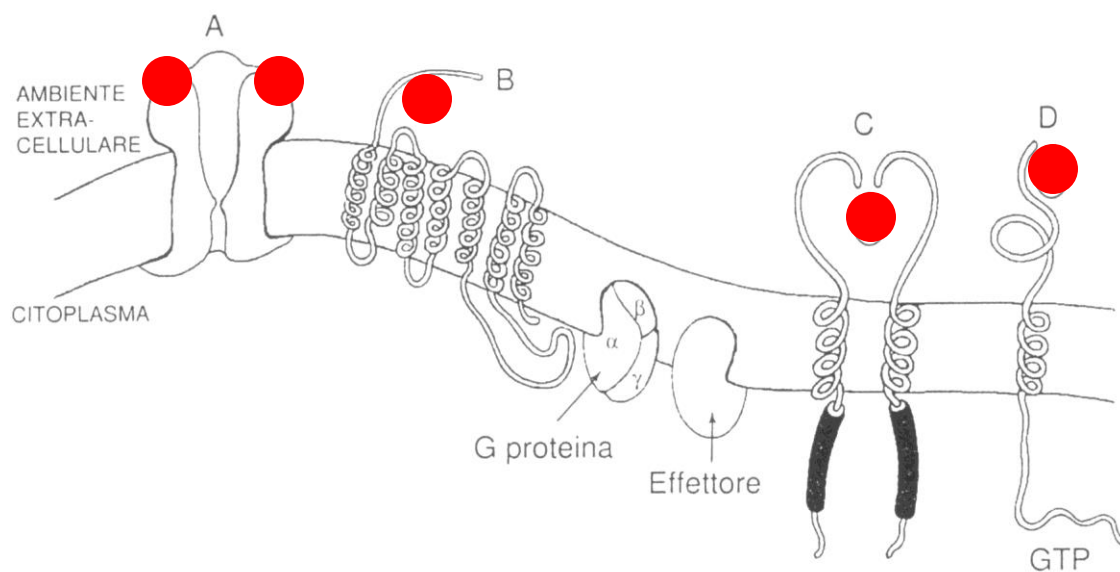


Fig. 4.2. Schema che illustra le varie famiglie di recettori di membrana. Canali ionici (A) aperti dal legame con il neurotrasmettitore. Recettori (B) accoppiati a proteine G con la caratteristica struttura a sette zone transmembranarie. Recettori (C) che possiedono attività protein chinasi intrinseca (cilindri neri) che fosforila residui aminoacidici tirosinici. Recettori (D) che possiedono una attività guanilato ciclasica intrinseca. Il simbolo colorato rappresenta il ligando.

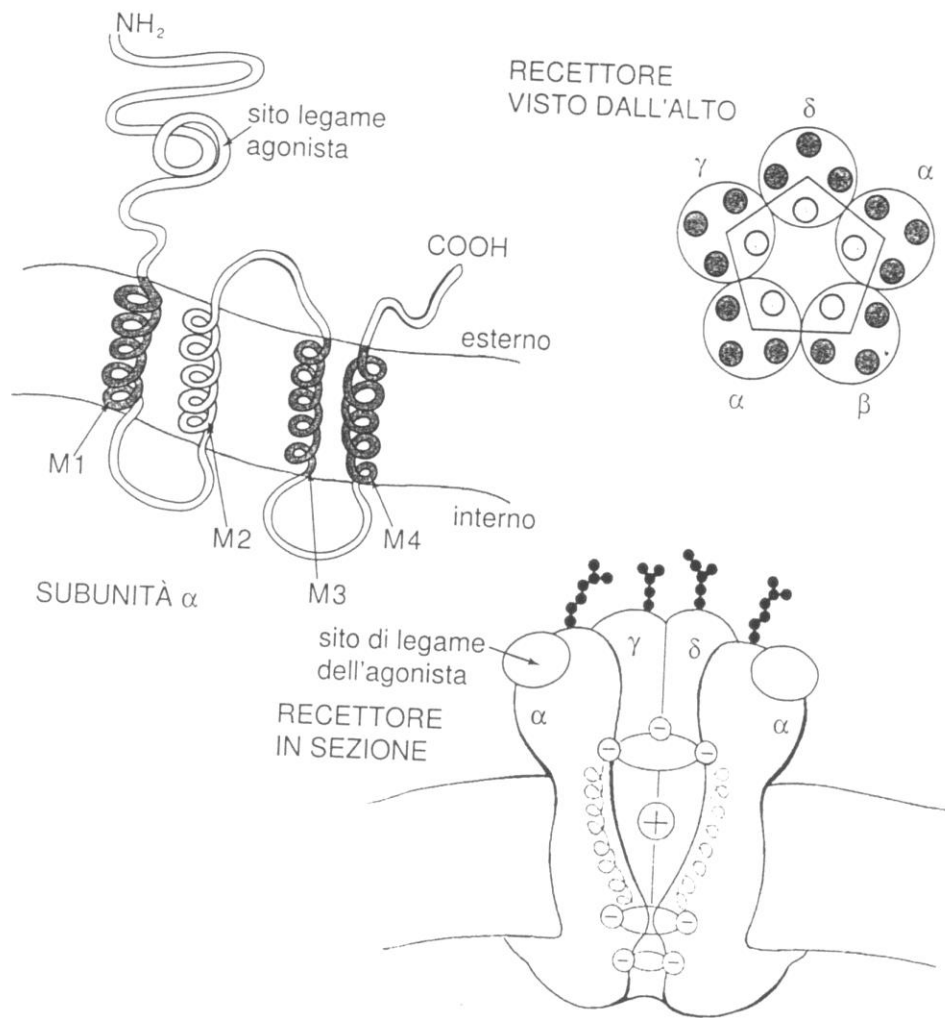


Fig. 4.3. Schema della struttura di un recettore canale: il recettore nicotinico muscolare. Esso è composto da 5 subunità (2α , β , γ , δ), che nel loro insieme formano un pentamero e delimitano un canale ionico che attraversa la membrana cellulare ed è permeabile ai cationi (prevalentemente Na^+). Ogni subunità è costituita da una catena peptidica che presenta, al terminale amminico, un'estesa porzione extracellulare; qui, nelle subunità α , è posto il sito di legame per l'acetilcolina. I quattro territori transmembranari sono identificati dalle sigle M1-M4. Essi sono organizzati spazialmente in modo che i tratti M2 delle 5 subunità formino le pareti del canale. Nello schema del recettore visto in sezione sono stati visualizzati i tre anelli carichi che sono importanti per la selezione degli ioni che passano attraverso il canale. Essi sono formati da aminoacidi posti in registro nei tratti M2 di ciascuna delle 5 subunità.

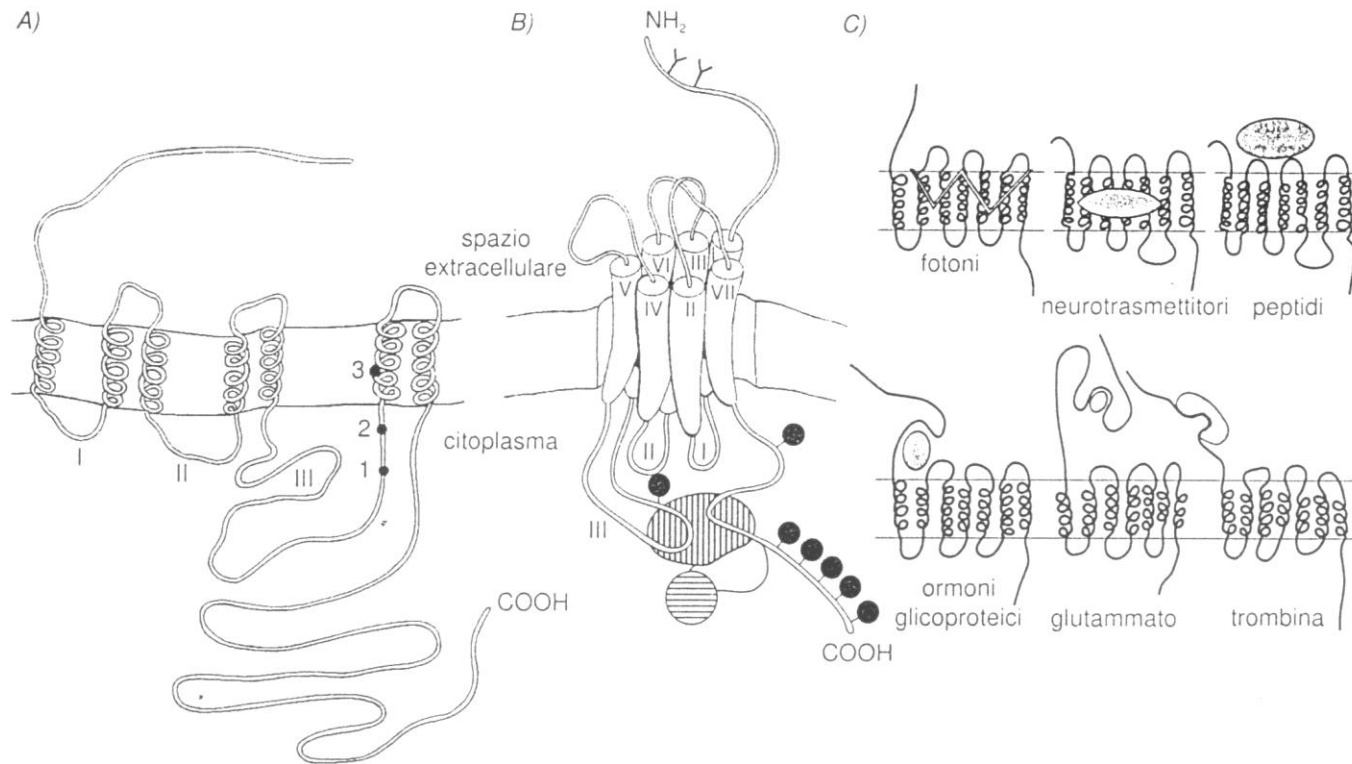
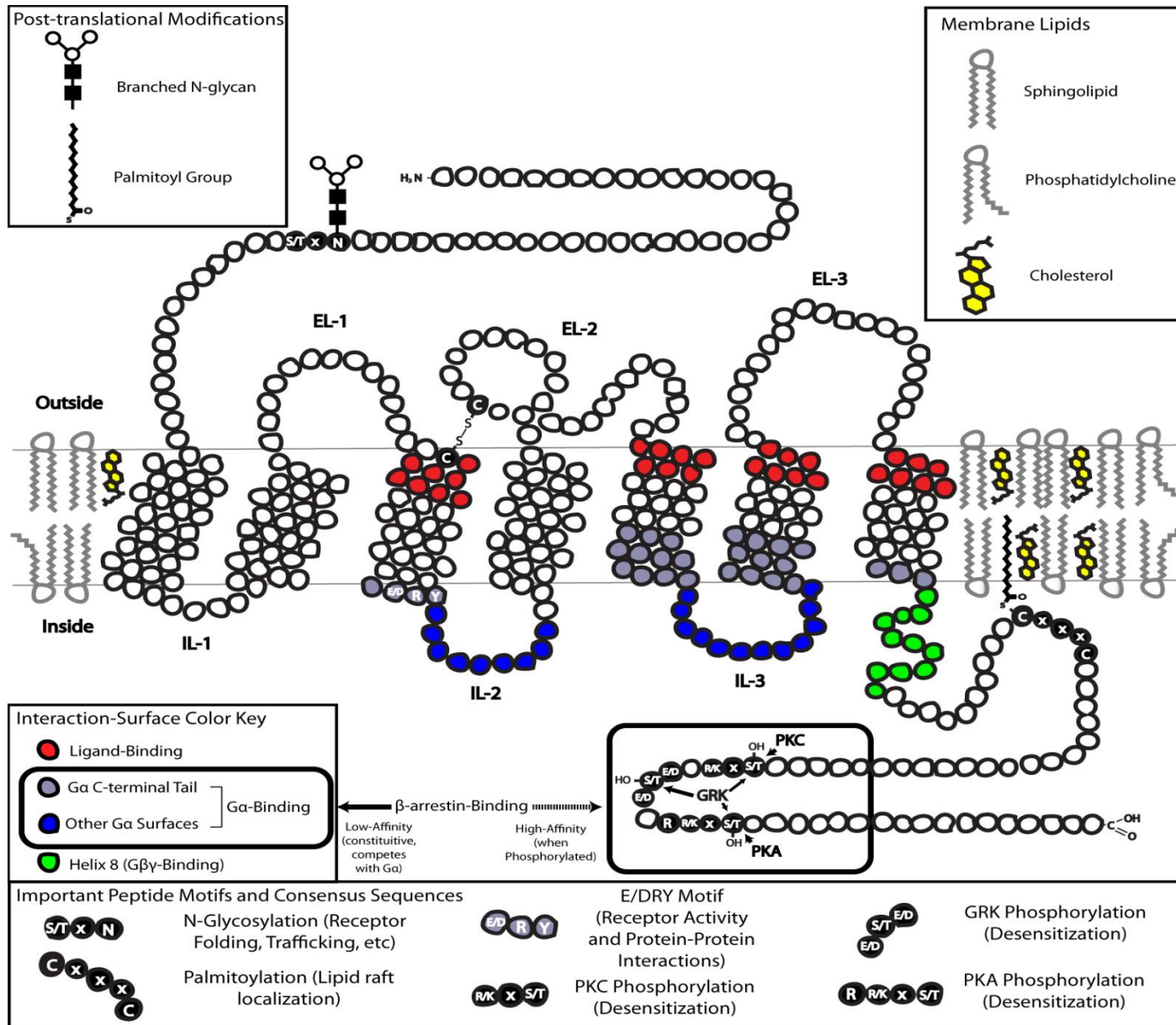


Fig. 6.1. I recettori accoppiati a proteine G sono formati da un unico filamento proteico che attraversa sette volte la membrana plasmatica (mostrato in modo schematico nella figura A). La sequenza aminoacidica ha il terminale aminico in posizione extracellulare mentre quello carbossilico è intracellulare; oltre ai sette territori transmembrana, numerati da I a VII (numerazione mostrata in B), vi sono tre tratti (chiamati *loops* o anse) extracellulari e tre intracellulari. La figura B) mostra un modello tridimensionale di recettore accoppiato a proteina G. Le Y presenti al terminale NH₂ indicano i siti di glicosilazione mentre i tondini pieni presenti nei territori intracellulari indicano i siti di fosforilazione. In questo modello si vede bene come il sito di legame per la proteina G, da cui dipende la specificità della risposta all'attivazione recettoriale, è formato dalla III ansa intracellulare in combinazione con il territorio carbossiterminale. In queste anse sono presenti anche siti di fosforilazione importanti per il controllo cellulare della funzionalità del recettore. Mutazioni della sequenza originale di un recettore possono essere causa di patologie: nella figura A) sono evidenziati i siti delle mutazioni spontanee identificati nei recettori per TSH (1,2) e LH (3). Queste mutazioni, che rendono i recettori costitutivamente attivi, sono responsabili rispettivamente della formazione di adenomi tiroidei e di pubertà precoce. Nella figura C) sono mostrate le diverse strategie utilizzate dai recettori accoppiati a G proteine per legare l'agonista e trasdurre il messaggio. Nel caso dei fotoni, di alcuni neurotrasmettitori e di piccoli ligandi, il sito di legame per l'agonista è formato da alcuni territori transmembranari e localizzato in una tasca presente nello spessore della membrana plasmatica. Peptidi e citochine riconoscono un sito di legame presente sulla superficie extracellulare del recettore. Ormoni glicoproteici si legano ad una porzione N-terminale del loro recettore: qui fissati, essi vengono portati a contatto con la zona attiva del sito di legame che è presente sulla superficie extracellulare del recettore. Nel caso di glutammato e trombina, l'attivazione è dovuta ad interazione della superficie del recettore con un tratto N-terminale del recettore stesso. Il glutammato compie questo processo legandosi al terminale aminico e costringendolo a piegarsi sulla superficie extracellulare del recettore; la trombina invece taglia un pezzo del recettore generando un nuovo terminale aminico capace di attivare il recettore stesso.

GPCR sequence/function



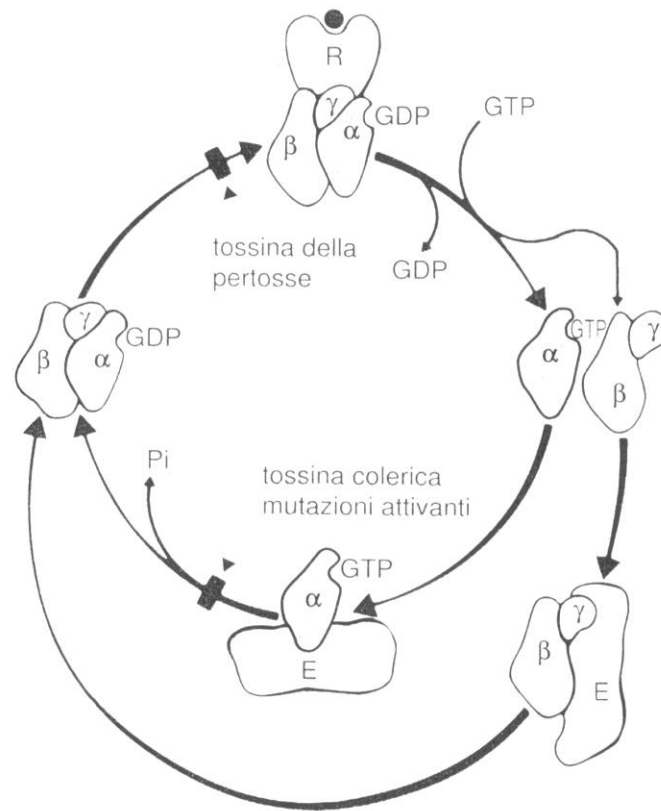
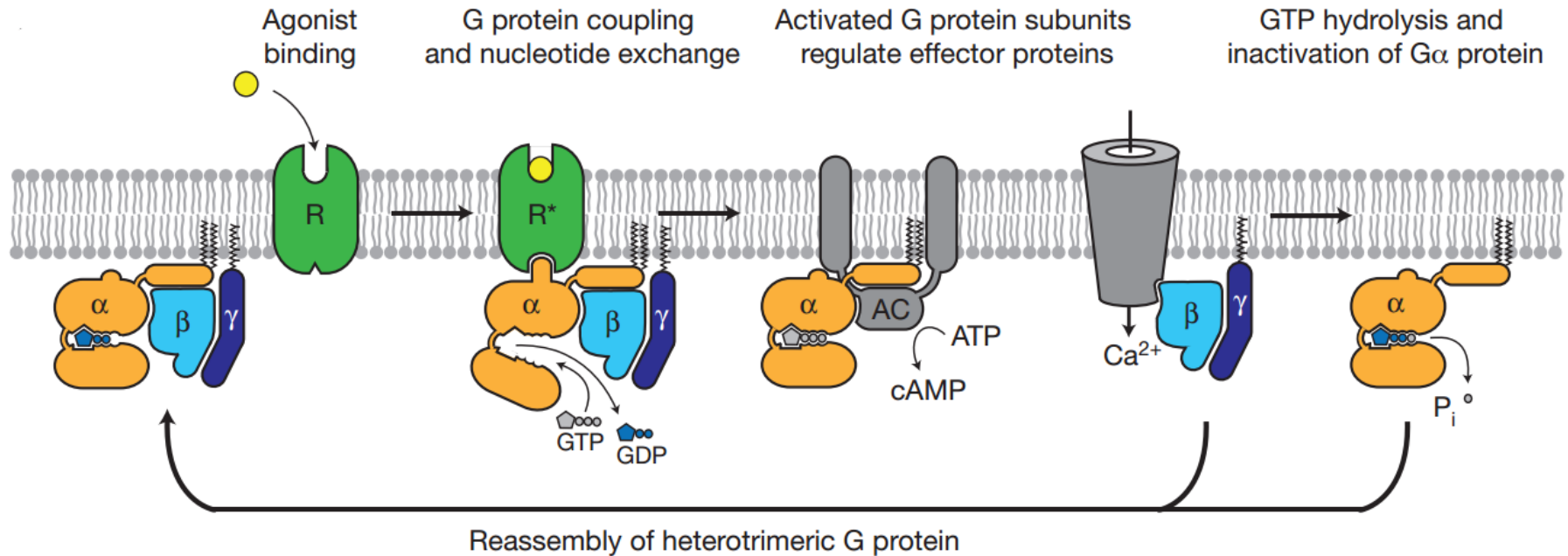


Fig. 6.2. Ciclo delle proteine G. Il legame dell'agonista al recettore stimola la formazione del complesso recettore-proteina G; questa è in fase trimerica e porta, nel sito di legame per i nucleotidi guanilici, una molecola di GDP. Il recettore stimola lo scambio GDP-GTP a seguito del quale la proteina G si dissocia dal recettore e le tre subunità si separano a formare la subunità α , a cui è legato il GTP e che è in grado di attivare l'effettore (E) e il complesso $\beta\gamma$. La subunità α attivata e il complesso $\beta\gamma$ (dimostrato per alcuni casi) si legano agli effettori modulandone l'attività. La subunità α è dotata anche di attività GTPasica e quindi idrolizza il GTP che porta legato e lo trasforma in GDP; a questo punto essa perde la capacità di legare l'effettore e si riassocia al complesso $\beta\gamma$. Le tossine batteriche del colera e della pertosse sono in grado di modificare la subunità α , alterando il normale funzionamento del ciclo della proteina G.

GPCR and G proteins

$\beta_2\text{AR-G}_s$



Recettore per	Proteina G	Effetto	Recettore per	Proteina G	Effettore
Neurotrasmettitori:					
Catecolamine					
Adrenergico β_1	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Fattore di rilascio dell'ACTH (CRF)	G_s	↑ Adenilato ciclasi
	↑ Canali al Ca^{2+}		Somatostatina	G_i	↓ Adenilato ciclasi
Adrenergico β_2, β_3	G_s	↑ Adenilato ciclasi		G_o	↑ Canali al K^+
Adrenergico α_1	G_q	↑ Fosfolipasi C			↓ Canali al Ca^{2+}
Adrenergico α_2	G_i	↓ Adenilato ciclasi	Vasopressina	G_q	↑ Fosfolipasi C
	↑ Canali al K^+		V_1	G_s	↑ Adenilato ciclasi
	G_o ↓ Canali al Ca^{2+}		Glucagone	G_s	↑ Adenilato ciclasi
Dopamina			Ormone paratiroideo (PTH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi
D_1	G_s	↑ Adenilato ciclasi		$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
D_2	G_i	↓ Adenilato ciclasi	Calcitonina	G_s	↑ Adenilato ciclasi
	↑ Canali al K^+			$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
	G_o ↓ Canali al Ca^{2+}		Altri fattori di regolazione:		
Serotonina			Trombina	G_i	↓ Adenilato ciclasi
5-HT ₁	G_i	↓ Adenilato ciclasi		$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₂	G_q	↑ Fosfolipasi C	Bradichinina		
5-HT ₄	G_s	↑ Adenilato ciclasi	B_2	G_q	↑ Fosfolipasi C
Acetilcolina			Eicosanoidi:		
Muscarinico M_1, M_3, M_5	G_q	↑ Fosfolipasi C	Prostaglandina PGE_2		
Muscarinico M_2, M_4	G_i	↓ Adenilato ciclasi	EP_3	G_i	↓ Adenilato ciclasi
	↑ Canali al K^+		Prostaglandina PGF_{2a}	G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormoni peptidici:			Prostaciclina PGI_2	G_s	↑ Adenilato ciclasi
Ormone adrenocorticotropo (ACTH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Leucotrieni LTC_4, LTD_4	G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormone luteinizzante (LH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Trombossano TXA_2	G_q	↑ Fosfolipasi C
	$G_q?$ ↑ Fosfolipasi C				
Ormone follicolo-stimolante (FSH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Fotoni		
Ormone tireotropo (TSH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Rodopsina	G_i	↑ cGMP fosfodiesterasi
	G_q ↑ Fosfolipasi C				
Ormone di rilascio del GH (GHRH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi			
Ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH)	G_q	↑ Fosfolipasi C			
Ormone di rilascio del TSH (TRH)	G_q	↑ Fosfolipasi C			
			↑ = stimolazione ↓ = inibizione		

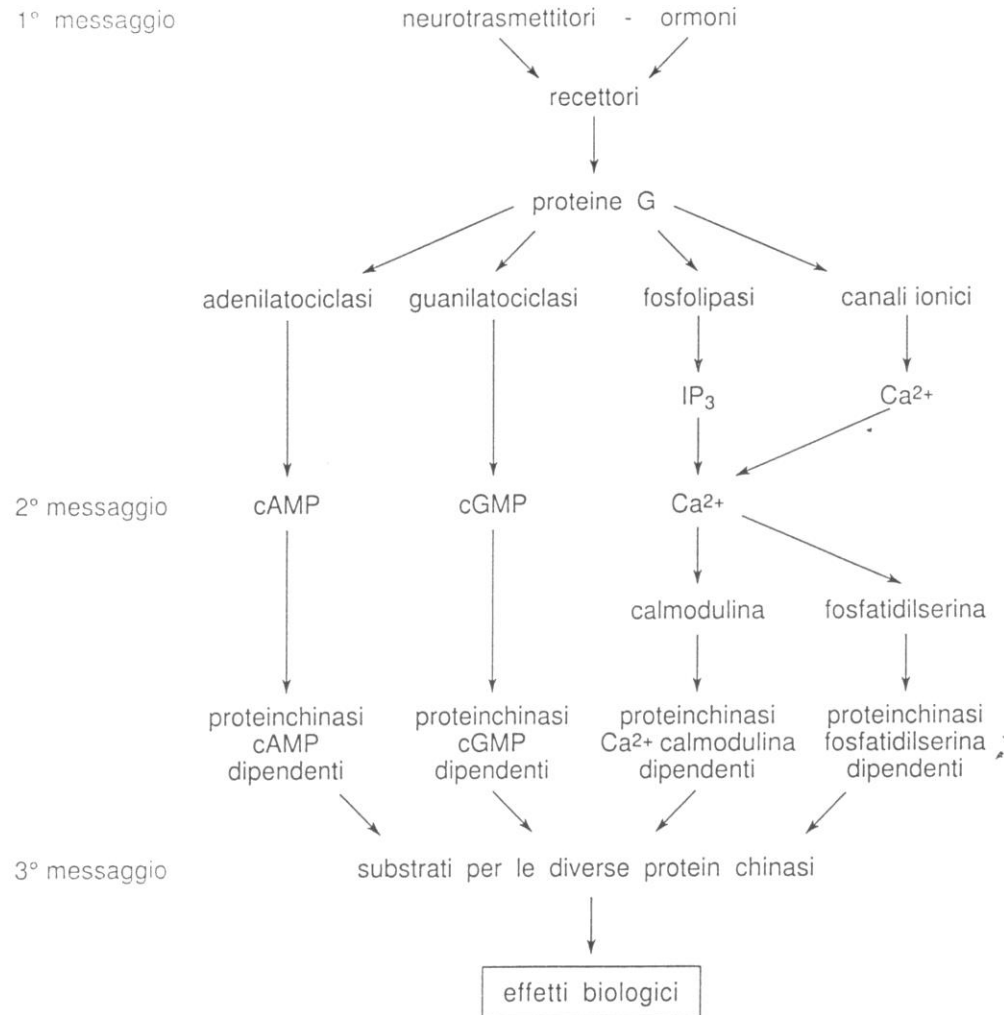
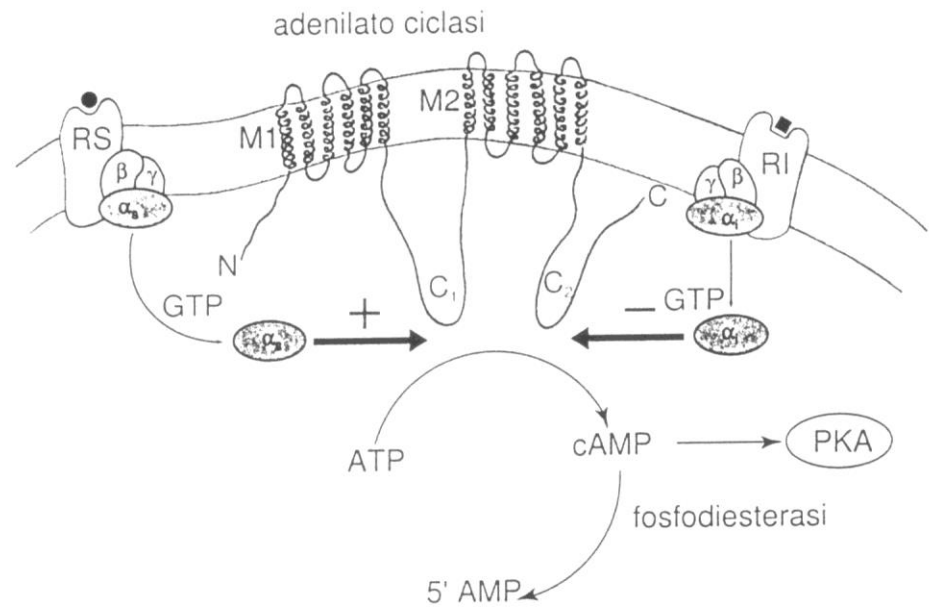


Fig. 4.4. Cascata amplificante innescata dalla interazione tra un neurotrasmettitore e un suo recettore accoppiato a proteina G. L'interazione trasmettitore-recettore attiva proteine G specifiche (per semplicità nello schema ne è mostrata solo una) che, a loro volta, possono attivare più molecole enzimatiche, dette effettori (es. fosfolipasi o ciclasti). Ognuna di esse sintetizza o libera numerose molecole di secondi messaggeri (es. cAMP, cGMP, IP₃) che a loro volta possono attivare numerose protein chinasi. La fosforilazione di substrati specifici dà inizio alla reazione cellulare che sfocia nella risposta biologica. Questa cascata amplifica il segnale generato dall'interazione agonista-recettore; il suo sviluppo può essere controllato ad ogni livello, sia positivamente che negativamente.

Fig. 6.4. Sistema dell'adenilato ciclasi. Sono rappresentati la struttura dell'enzima e i principali meccanismi della sua regolazione da parte di recettori stimolatori (RS) e inibitori (RI). Le subunità α delle proteine G sono rappresentate nel citoplasma solo per chiarezza del disegno e la loro posizione rispetto alla molecola dell'adenilato ciclasi è arbitraria. Stimolazione e inibizione sono indicate con + e - e sono indotte da interazioni con GTP- α_s o GTP- α_i rispettivamente. La stimolazione dell'adenilato ciclasi porta ad aumento della concentrazione intracellulare di cAMP e a conseguente attivazione della PKA ed inibizione delle fosfatasi. Il cAMP è infine idrolizzato dalle fosfodiesterasi.



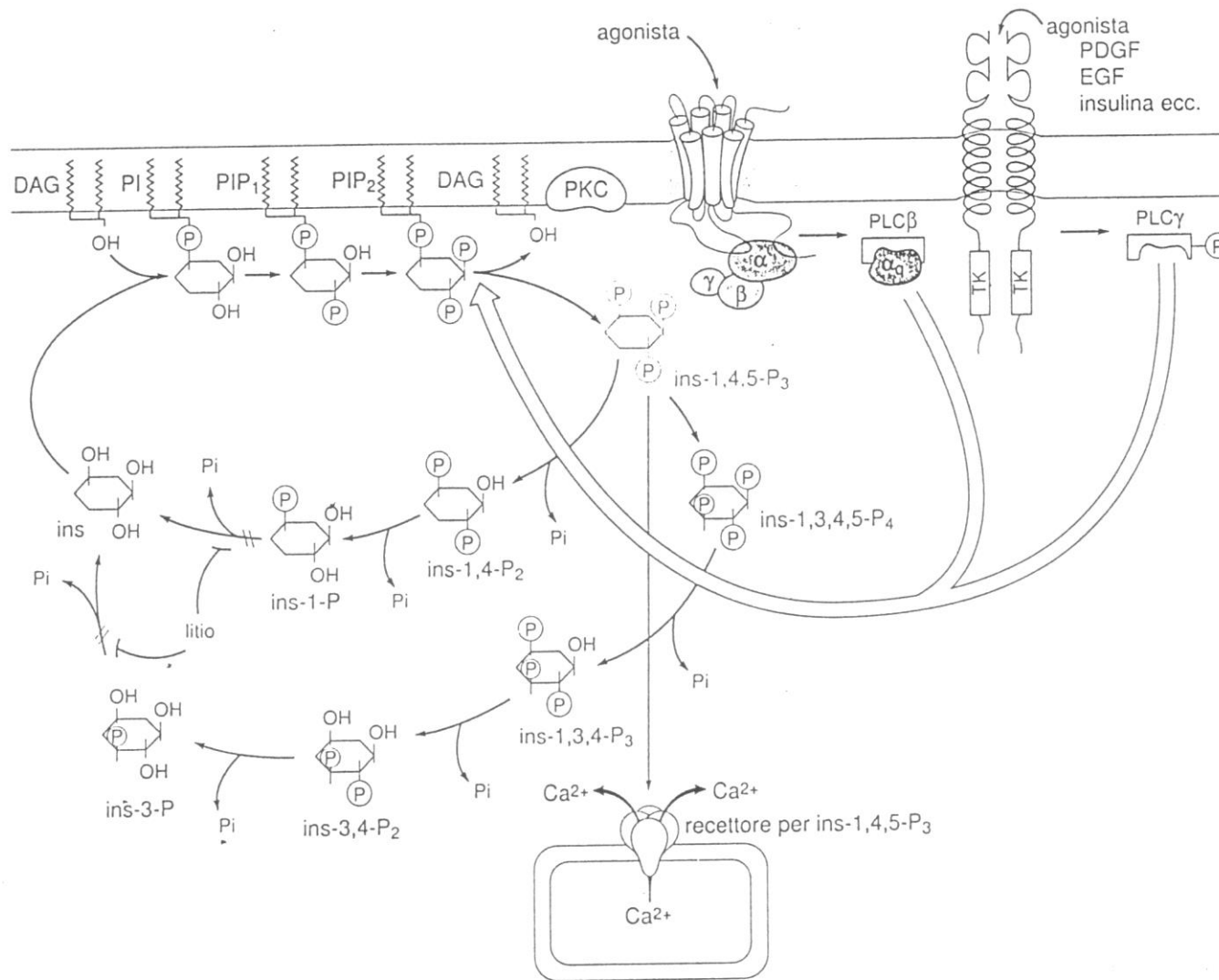


Fig. 6.5. Idrolisi dei fosfoinositidi. Sono rappresentati i due meccanismi di attivazione delle fosfolipasi C (PLC) di tipo β e di tipo γ da parte di recettori accoppiati a proteine G e di recettori ad attività tirosin chinasi, rispettivamente. Per chiarezza di disegno le due fosfolipasi sono rappresentate nel citoplasma. Nella realtà, come descritto nel testo, in seguito ad attivazione le fosfolipasi traslocano alla membrana dove sono localizzati i fosfoinositidi. Qui esse idrolizzano il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂) generando inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG); il primo, interagendo con un suo recettore specifico, induce liberazione di ioni calcio da depositi intracellulari a rapido scambio mentre il secondo è fondamentale per l'attivazione della proteinkinasi C (PKC). Sono rappresentate anche le vie metaboliche principali dell'IP₃ con i siti d'azione del litio, seguite dal ciclo di sintesi dei fosfoinositidi dall'inositolo e dal diacilglicerolo. PIP₂ = fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato; PIP = fosfatidilinositolo 4-fosfato; PI = fosfatidilinositolo; DAG = diacilglicerolo; Ins = inositolo; PKC = proteinkinasi C.

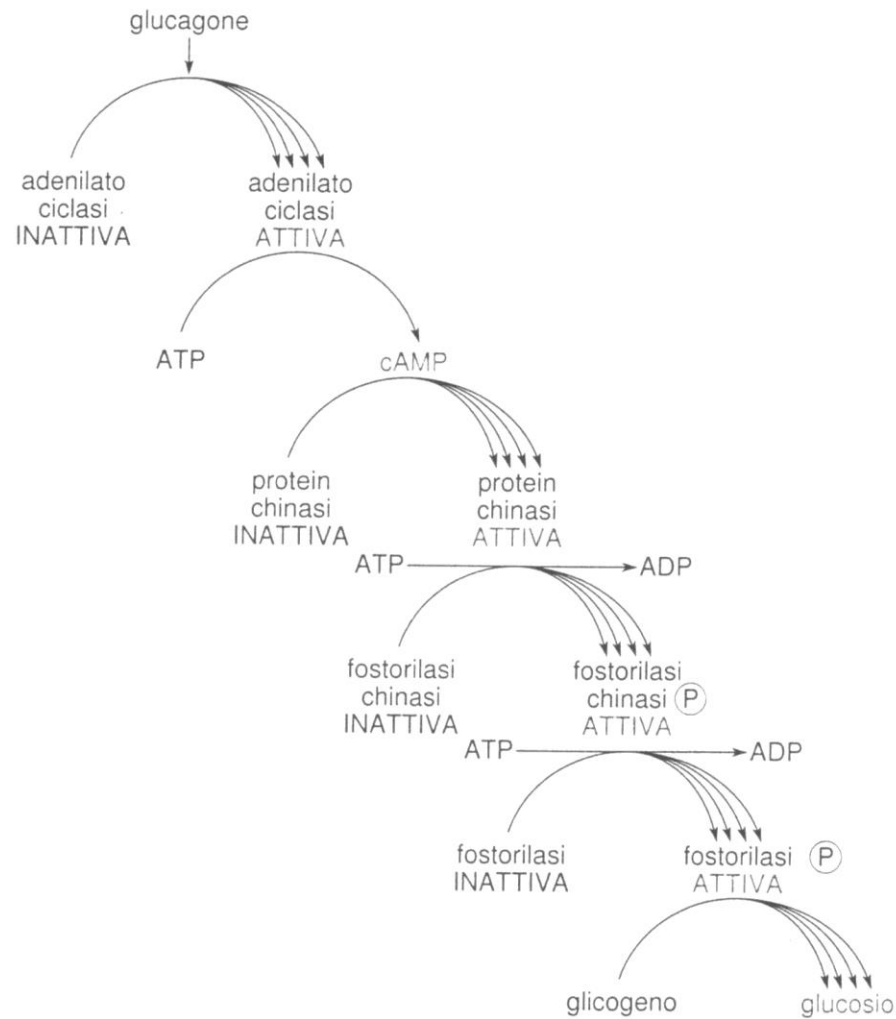
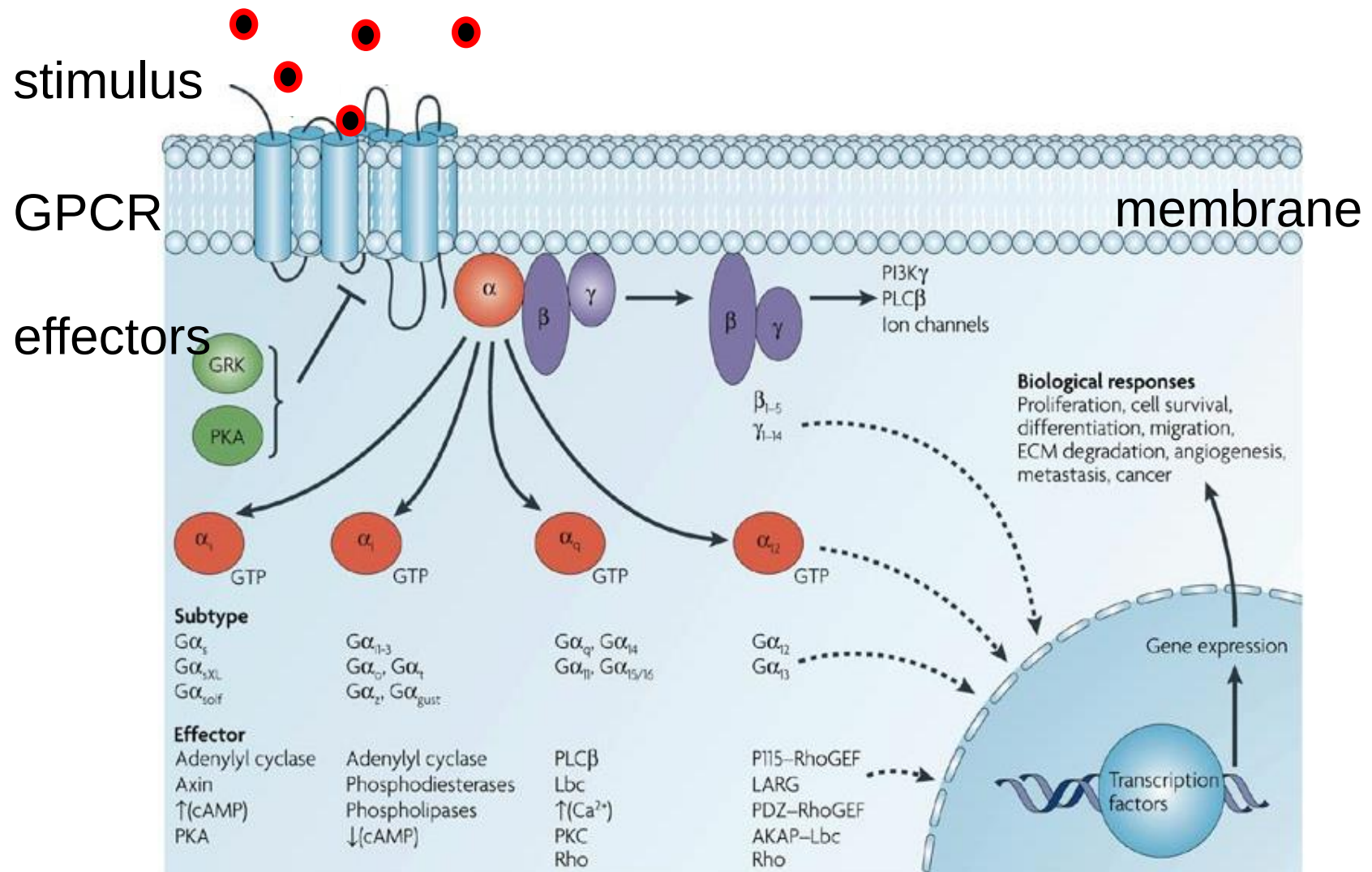
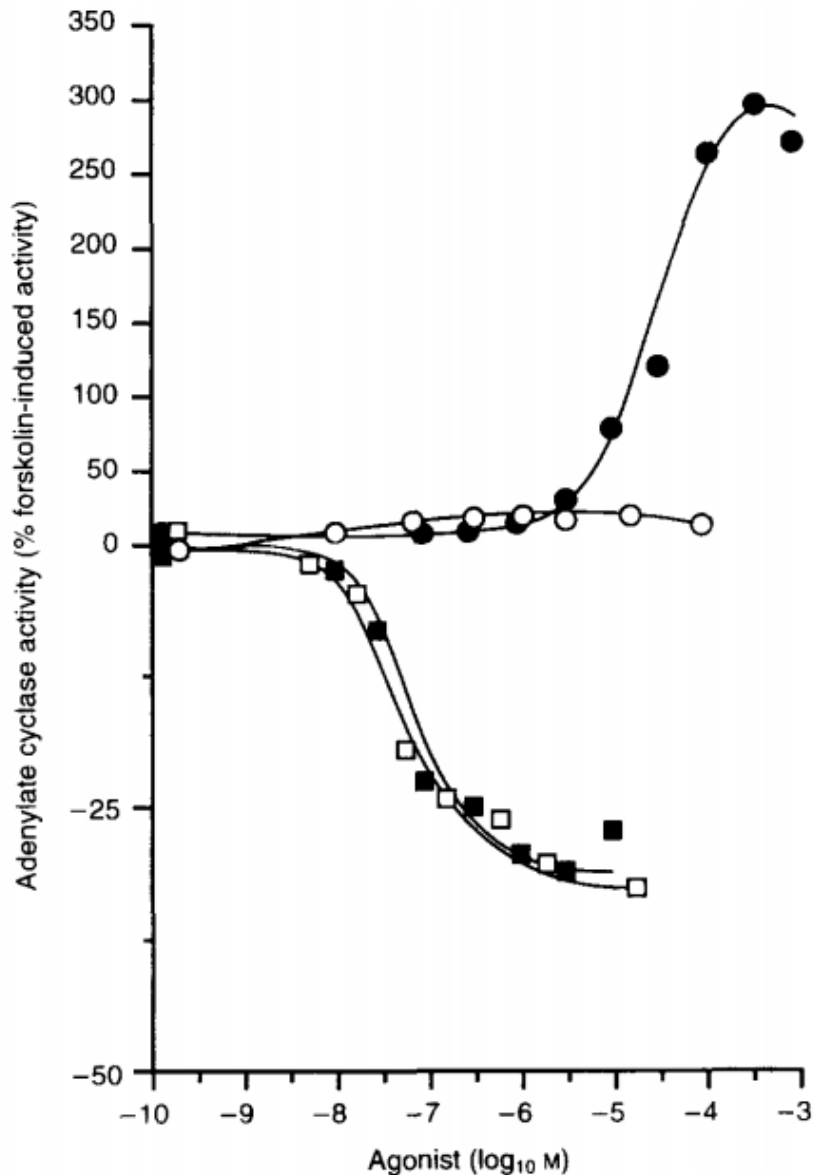


Fig. 3.9. Meccanismo di amplificazione a cascata del segnale. L'esempio riguarda l'attivazione della glicogenolisi da parte del glucagone. Il fattore di amplificazione della risposta ad ogni passaggio varia fra 10^2 e 10^6 .

stimulus / response

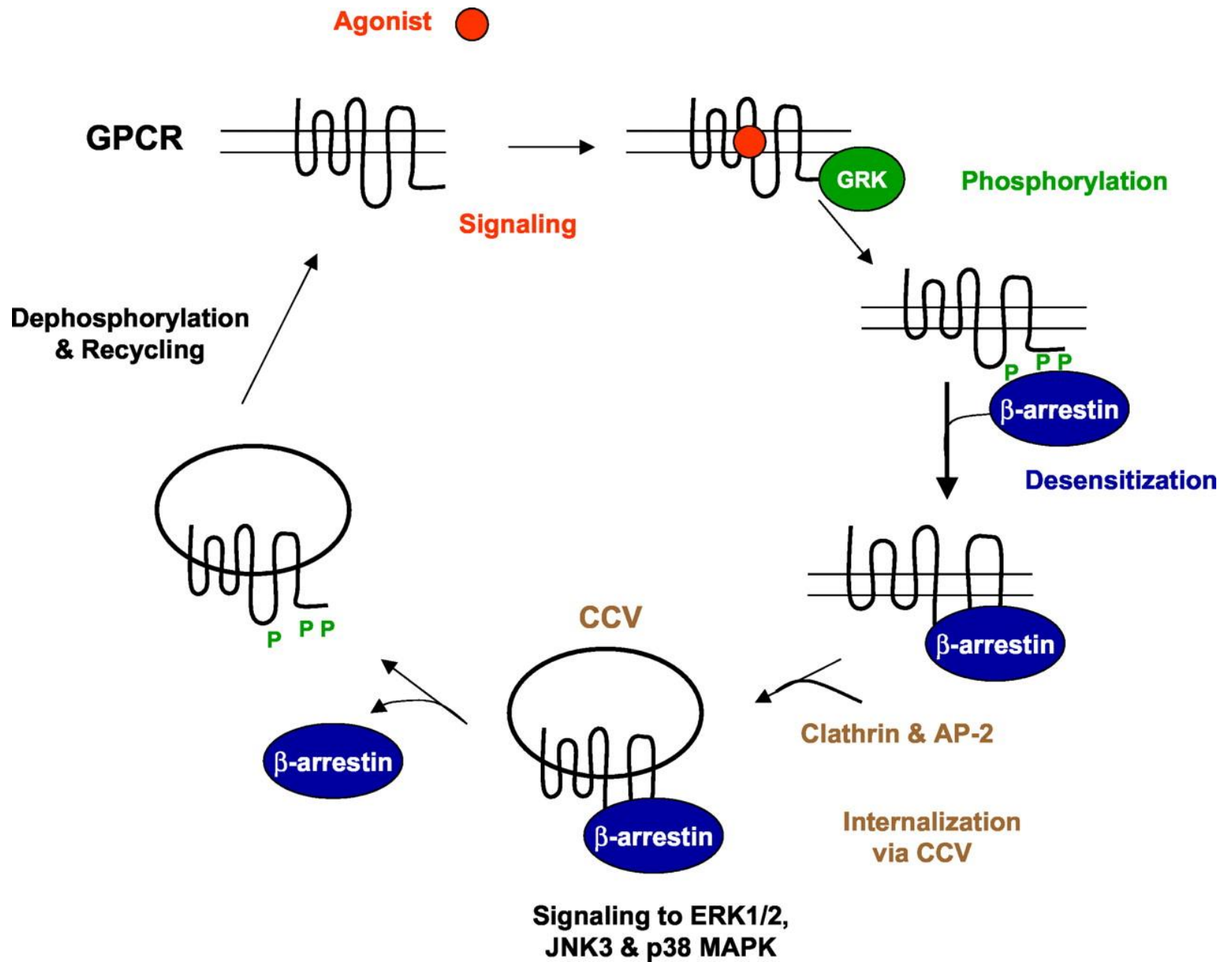


interesting enough...



Cells expressing α_2 -adrenoceptors

- ADRENALINE tested in presence of PTX or CHX (● or ■, respectively)
- OXYMETAZOLINE tested in presence of PTX or CHX (○ or □, respectively)



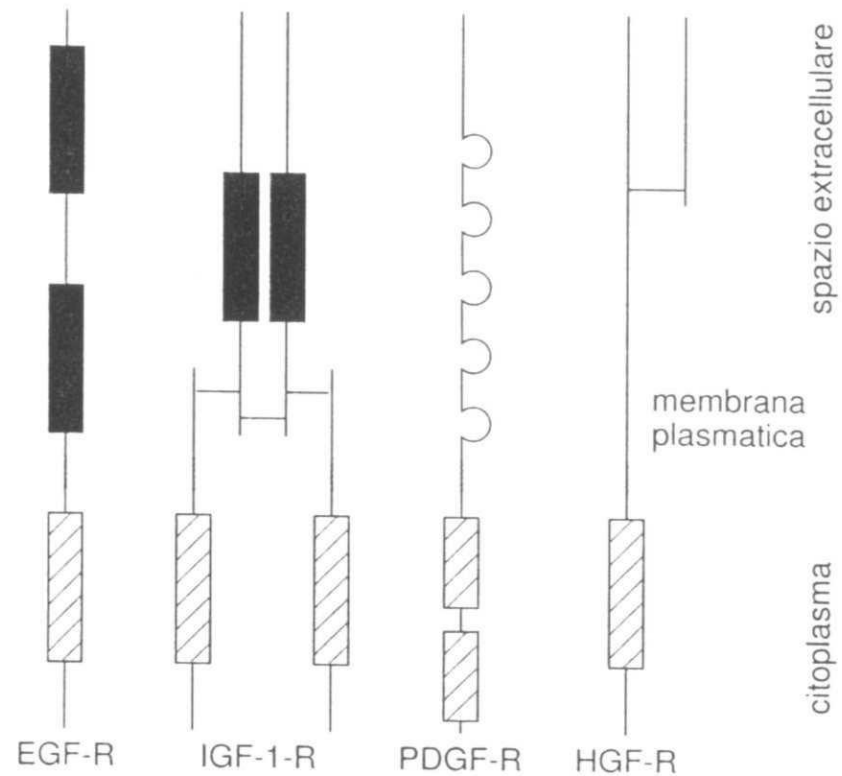


Fig. 8.1. Schema dell'architettura generale dei recettori per i fattori di crescita. Tutti i recettori hanno un dominio extracellulare (*in alto* nella figura) provvisto del sito di legame per il fattore di crescita corrispondente. Un tratto di catena composto da aminoacidi idrofobici attraversa la membrana e provvede alla connessione con il dominio tirosin chinasi (rettangolo tratteggiato), capace di generare un segnale intracellulare. EGF-R = recettore dell'EGF; IGF-1-R = recettore dell'IGF-1; PDGF-R = recettore del PDGF. HGF-R = recettore dell'HGF. (Modificata da P.M. Comoglio, *La Cellula: biologia molecolare e dello sviluppo*, UTET, 1993).

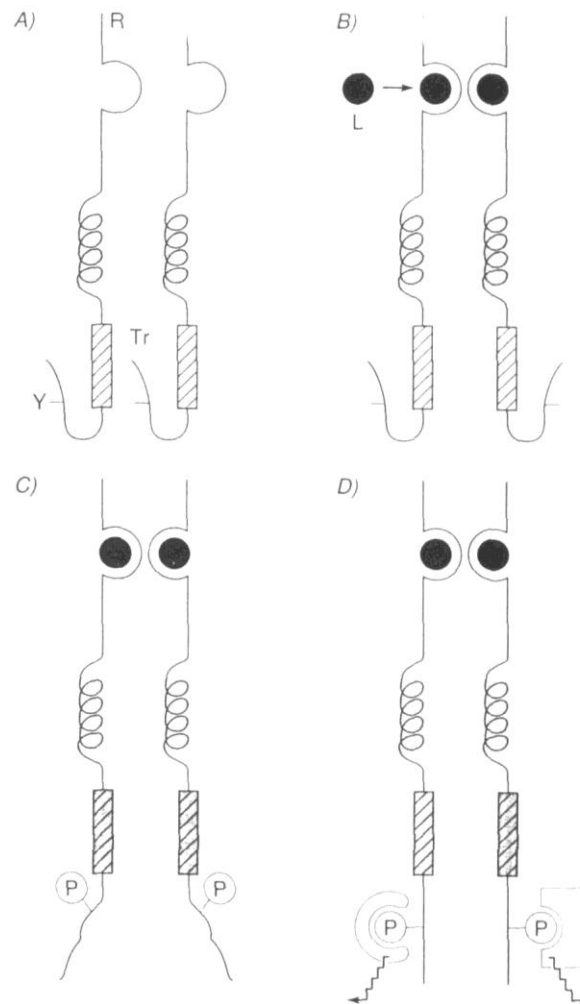


Fig. 8.4. Schema del meccanismo di attivazione recettoriale tramite dimerizzazione. *A)* In assenza di ligando, i recettori sono dispersi in forma monomerica sulla superficie della cellula. Il dominio tirosin chinasi è inattivo e la coda citoplasmatica non è fosforilata. *B)* Il ligando (L) occupa il sito e induce un cambiamento di conformazione della parte extracellulare del recettore che ne facilita la dimerizzazione. *C)* Nel dimero i domini citoplasmatici si avvicinano al di sotto di una distanza critica e si attivano trans-fosforilandosi reciprocamente. *D)* Un cambiamento conformazionale della regione citoplasmatica espone al microambiente circostante sequenze aminoacidiche critiche contenenti una o più tirosine fosforilate, capaci di legare trasduttori del segnale dotati di domini SH2. (Modificata da P.M. Comoglio, *La Cellula: biologia molecolare e dello sviluppo*, UTET, 1993).

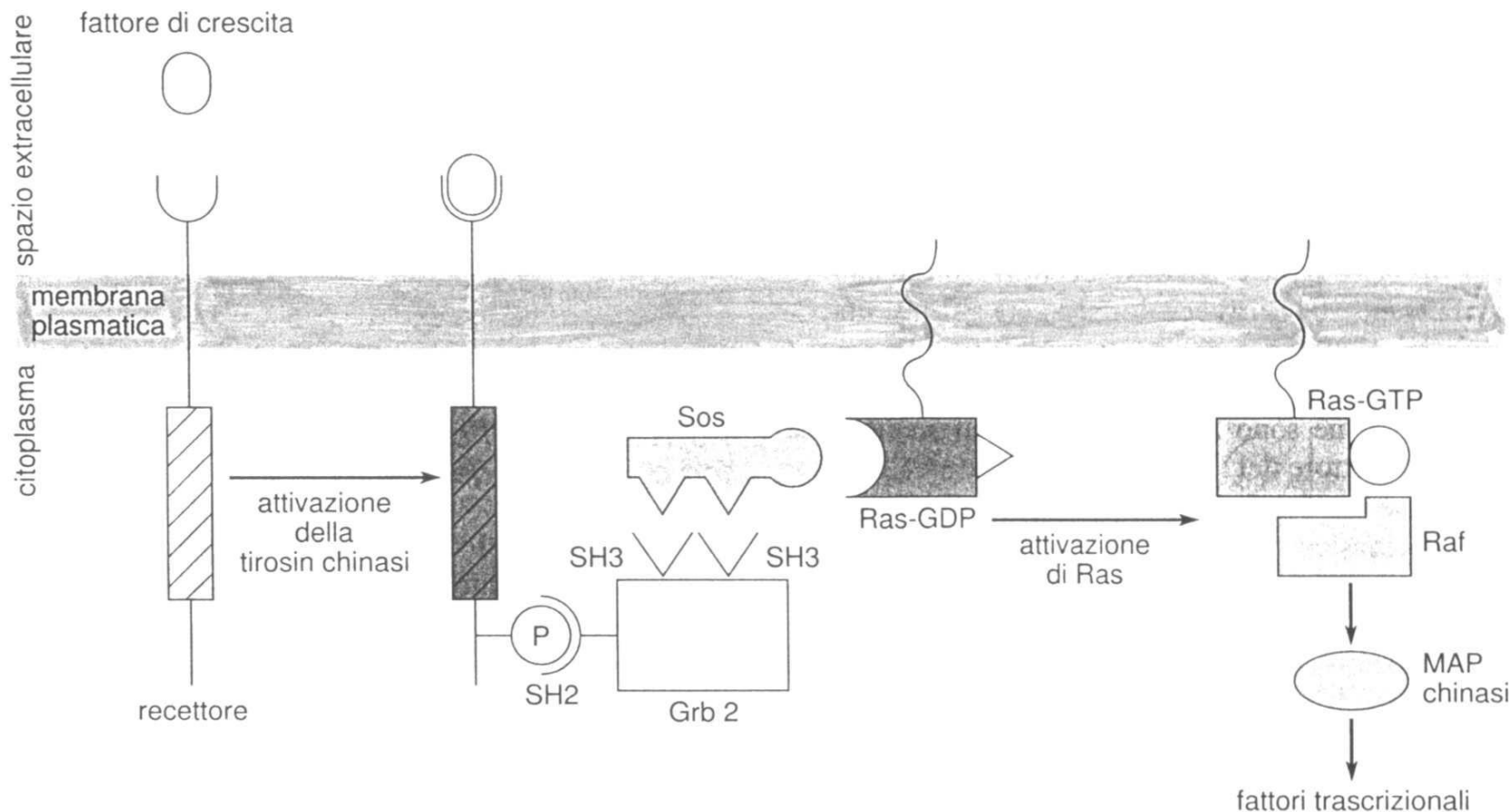


Fig. 8.6. Schema dei principali meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori per fattori di crescita. Il legame del fattore al recettore causa l'attivazione del dominio chinasi e la fosforilazione (P) delle tirosine di ancoraggio per i trasduttori. La molecola Grb-2 si associa alla tirosina fosforilata per mezzo del dominio SH2 e, tramite i due domini SH3, alla molecola Sos. Quest'ultima, reclutata alla membrana plasmatica, lega il complesso inattivo Ras-GDP e promuove lo scambio della molecola di GDP con una di GTP; il complesso Ras-GTP è un trasduttore attivo, capace di associare e stimolare la serin chinasi Raf. Questa innesca una cascata di fosforilazioni mediate dalle chinasi citoplasmatiche della famiglia *MAP* (acronimo di Mitogen Activated Protein- Kinase). I bersagli finali di questa cascata sono i fattori nucleari che controllano la trascrizione dei geni responsabili della risposta mitogenica.

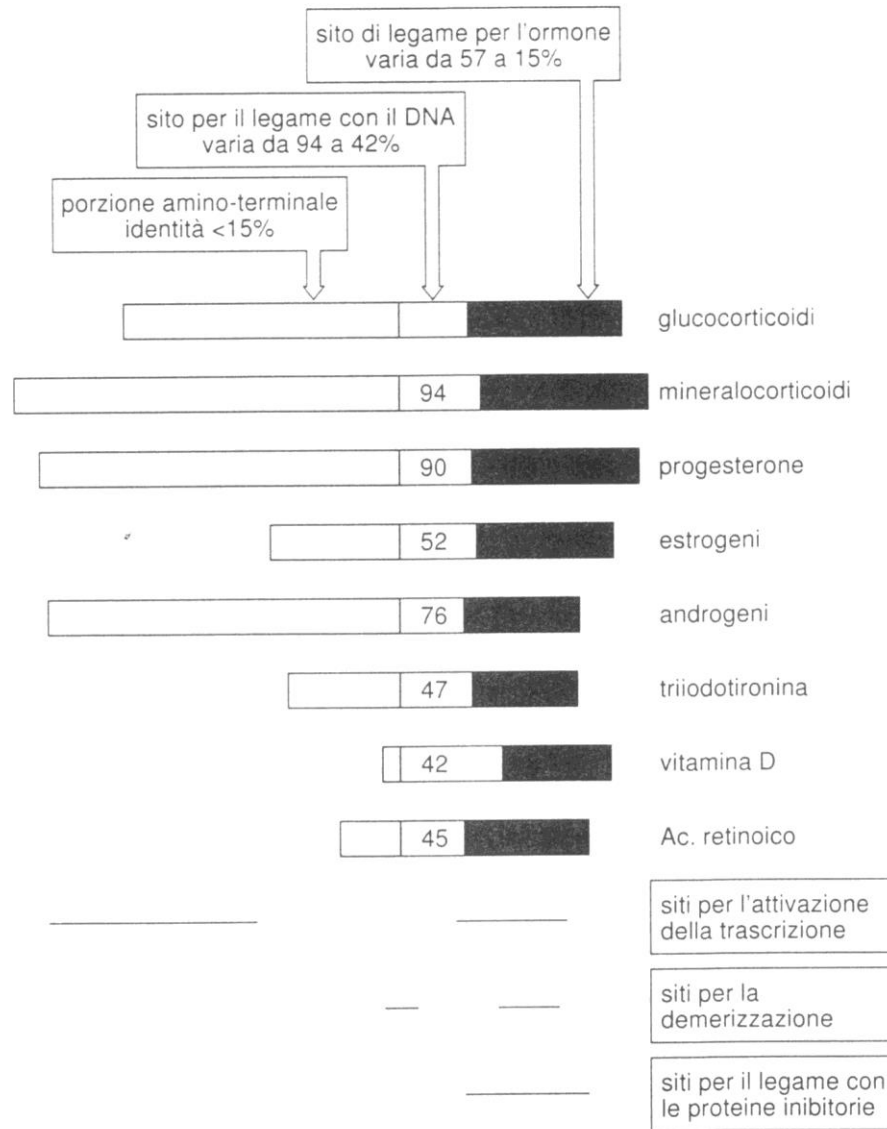


Fig. 15.5. Organizzazione strutturale e funzionale dei recettori intracellulari. Le proteine appartenenti alla superfamiglia dei recettori degli ormoni steroidei hanno una organizzazione strutturale simile: la regione N-terminale è la meno conservata tra le diverse specie recettoriali ed è in gran parte responsabile della specificità d'azione dei singoli recettori; il territorio deputato al riconoscimento del DNA è molto conservato (i numeri indicano la percentuale di omologia) ed è posizionato all'interno della molecola recettoriale; la regione C-terminale contiene il sito di legame del ligando.

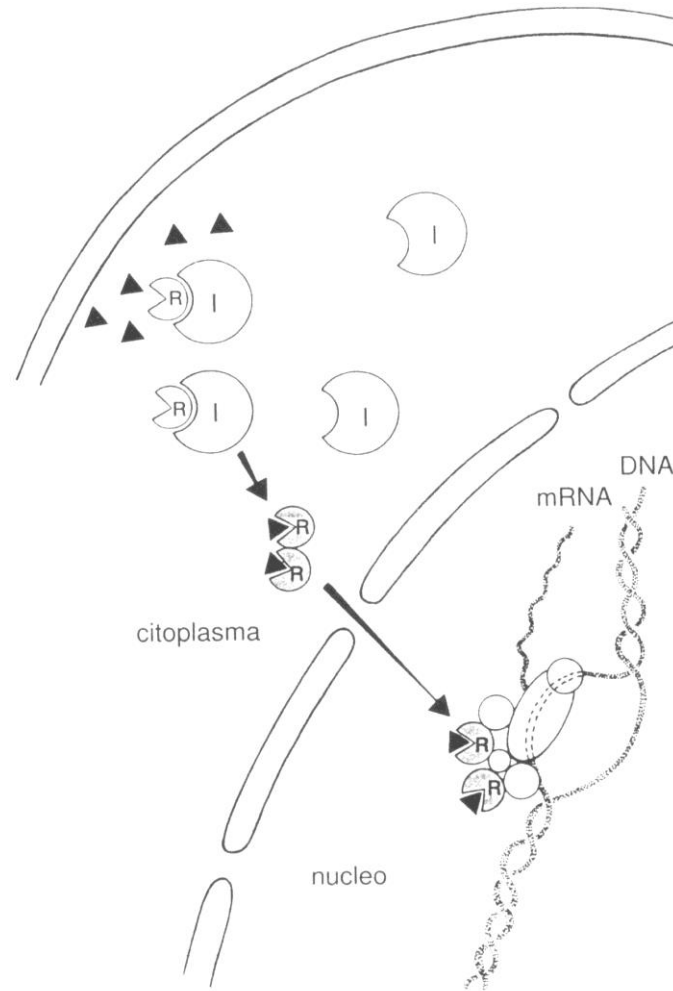
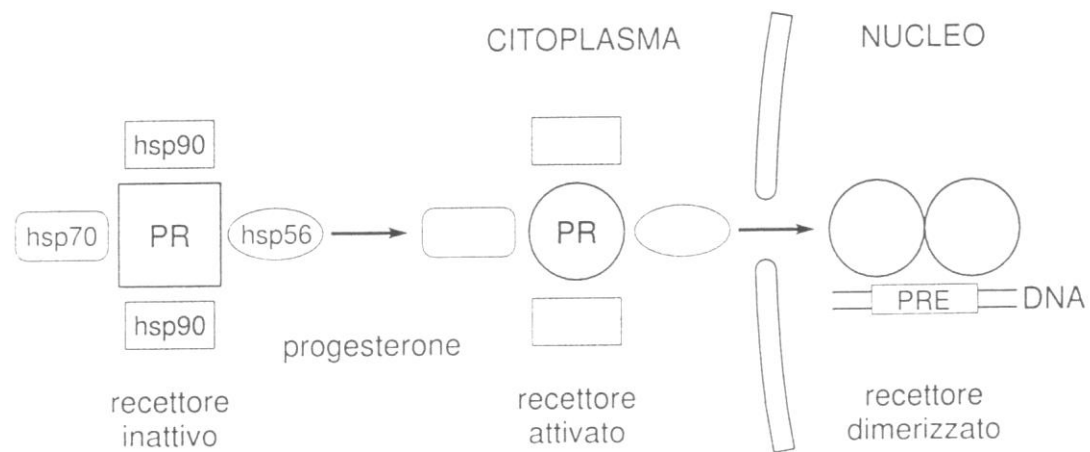


Fig. 15.1. Meccanismo d'azione dei recettori intracellulari. L'ormone, lipofilo, attraversa la membrana cellulare, si lega al recettore specifico (R) e lo rimuove dal legame con proteine inibitorie (I). Il complesso recettore-ligando dimerizza e acquisisce la capacità di riconoscere sequenze specifiche di DNA alle quali si lega regolando la trascrizione dei geni bersaglio. L'RNA messaggero neosintetizzato raggiunge il citoplasma dove avviene la sintesi proteica.

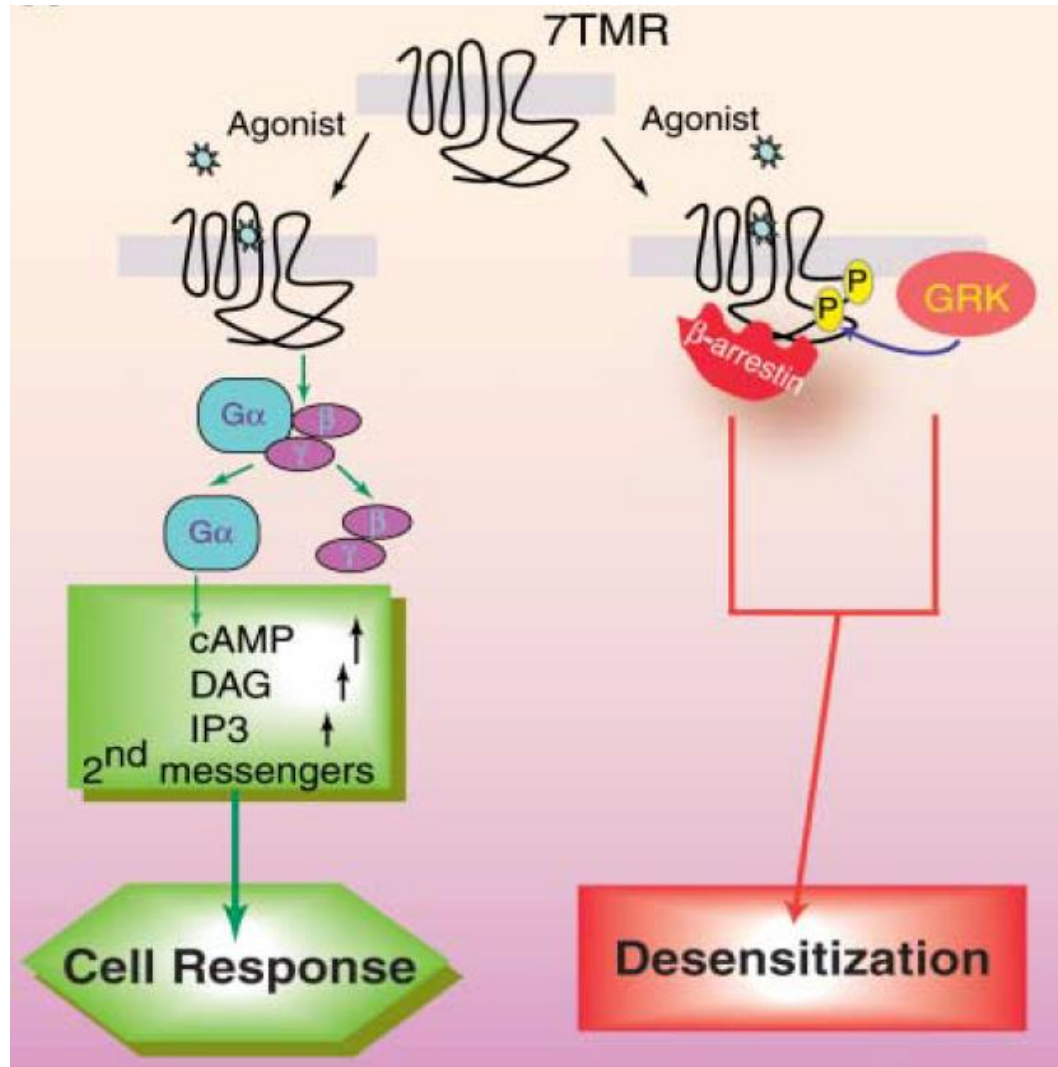
Fig. 4.1. Schema del meccanismo di trasduzione del segnale dei recettori per gli ormoni steroidei. In questo esempio il recettore per il progesterone (PR) è associato con tre *heat-shock proteins* (hsp) ed è inattivo. Quando il progesterone si lega al recettore, esso cambia conformazione, si dissocia dalle HSP, dimerizza ed è quindi trasportato nel nucleo. Qui interagisce con sequenze specifiche di DNA, dette *progesteron-response element* (PRE) e presenti nel promotore di geni sensibili al progesterone. In tal modo viene attivata la trascrizione del gene.



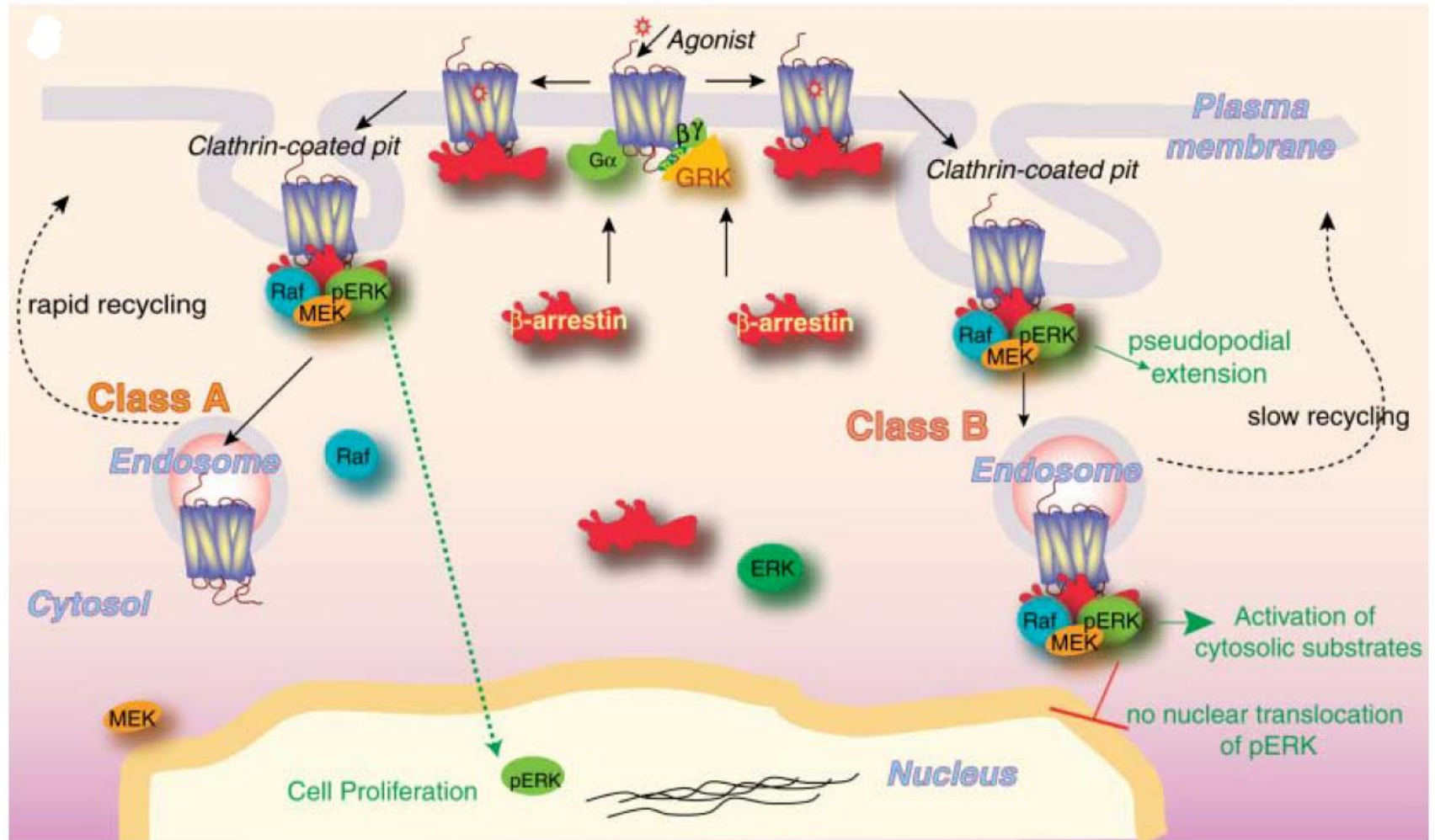
arrestins

- 1987** functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: Potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-KDa protein) (by Lefkowitz)
- 1985** “antigen S” identified as the 48KDa protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods (visual and pineal arrestin)
- 1990** “ β -arrestin” a protein that regulates β -adrenergic receptor function
- 1992** β -arrestin 2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family
- 1996** β -arrestins act as clathrin adaptors in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor
- 1999** β -arrestin dependent formation of β 2adrenergic receptor-SRC protein kinase complexes
- 2000** the proliferative and antiapoptotic effects of Substance P are facilitated by formation of β -arrestin dependent scaffolding complex
- 2000** differential affinity of visual arrestin, β -arrestin 1, and 2 for GPCRs delineate two major classes of receptors (fast vs slow internalization/recycling GPCR)

Classical model of how arrestins modulate GPCRs

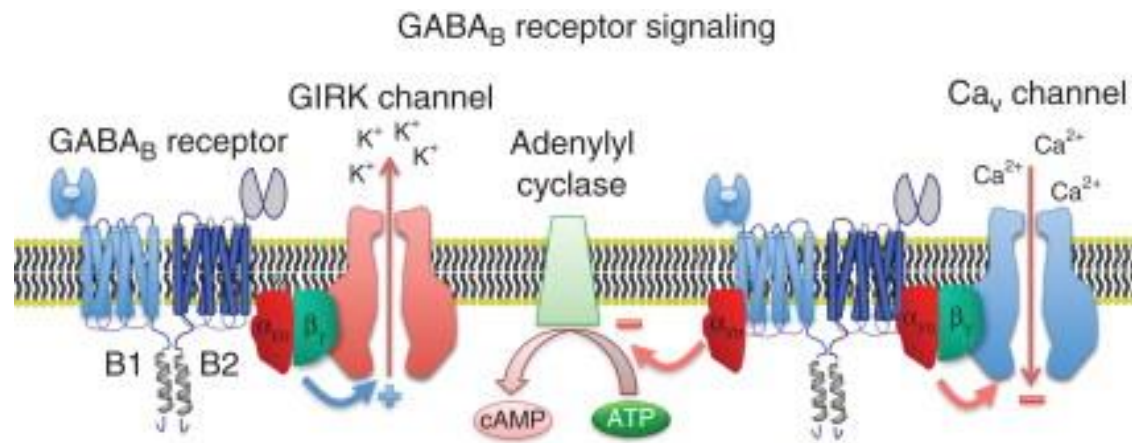


arrestins and internalization processes

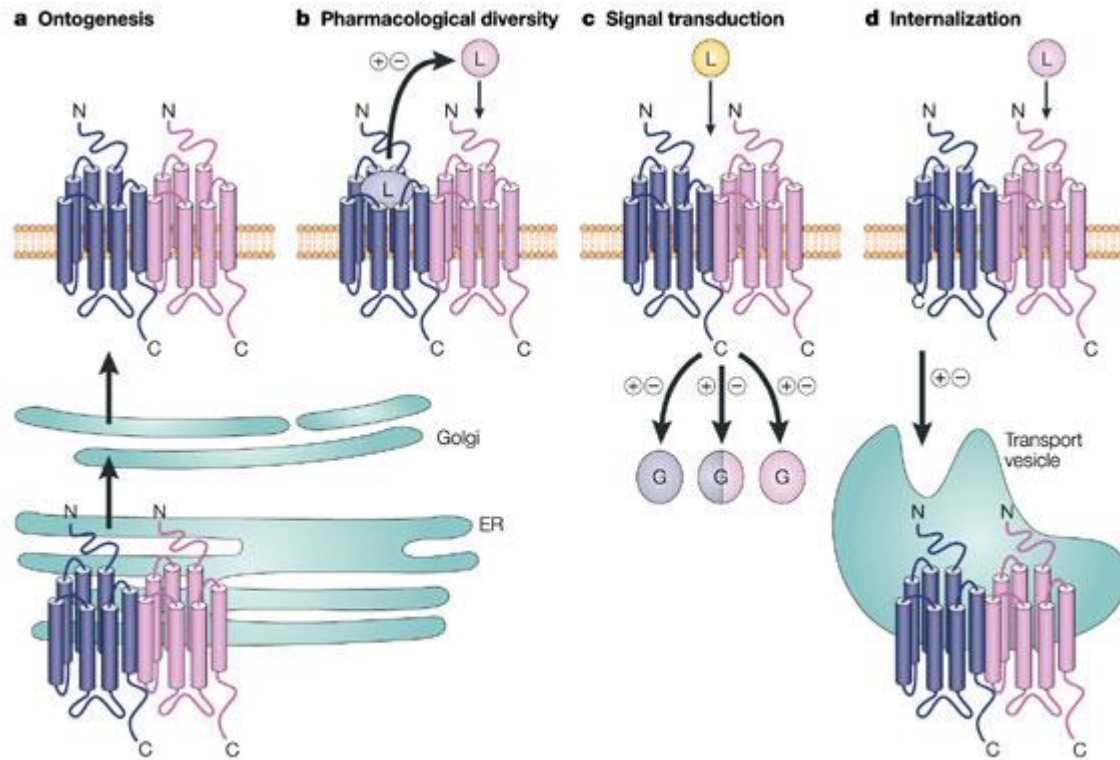


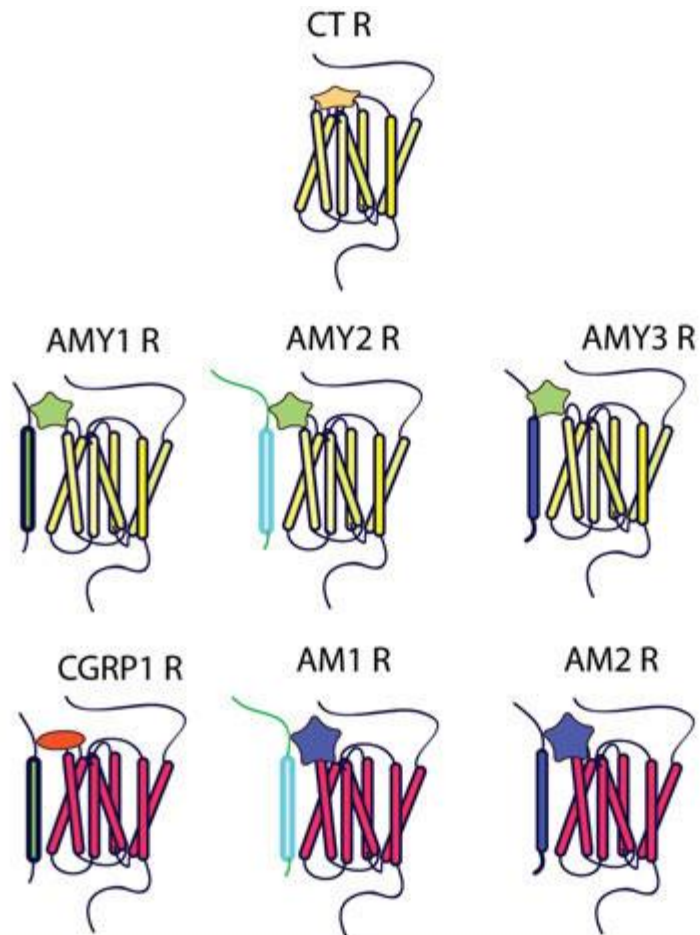
Receptor Dimers

GABA_B story



Receptor heterodimerization





CT-R



CL-R



RAMP1



RAMP2



RAMP3

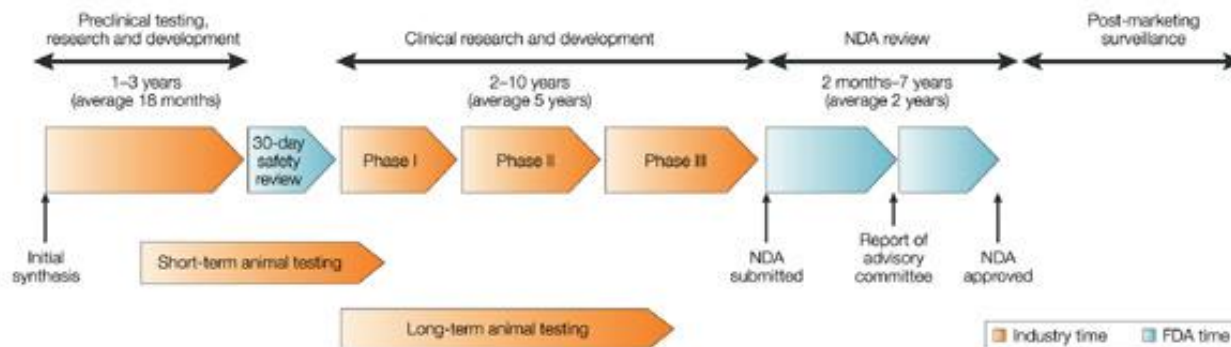
 Calcitonin (CT)

 Amylin (AMY)

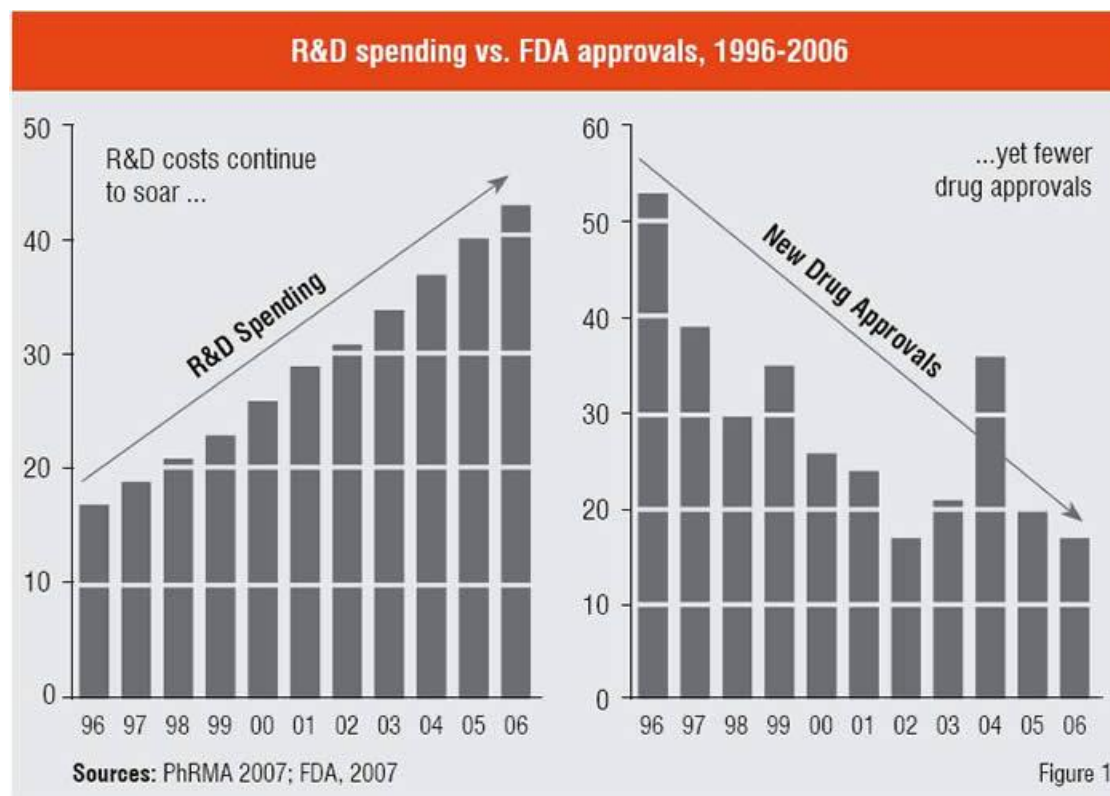
 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

 Adrenomedullin (AM)

R Receptor



Nature Reviews | Drug Discovery



Interazioni farmaco-recettore e risposta quantitativa ai farmaci

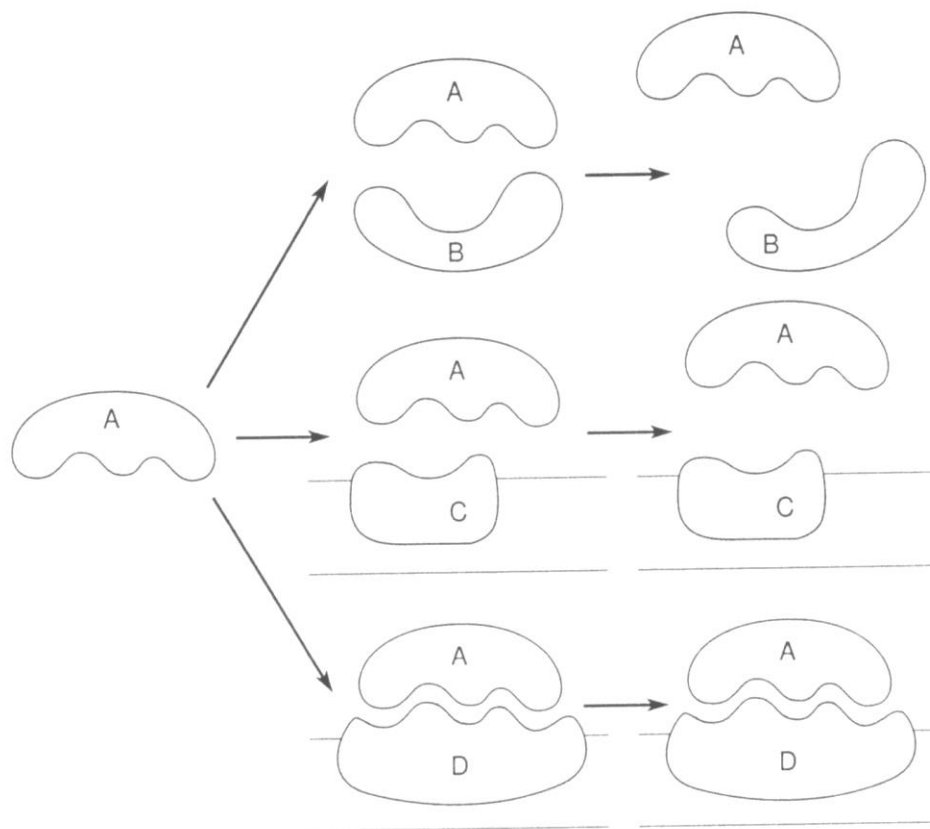
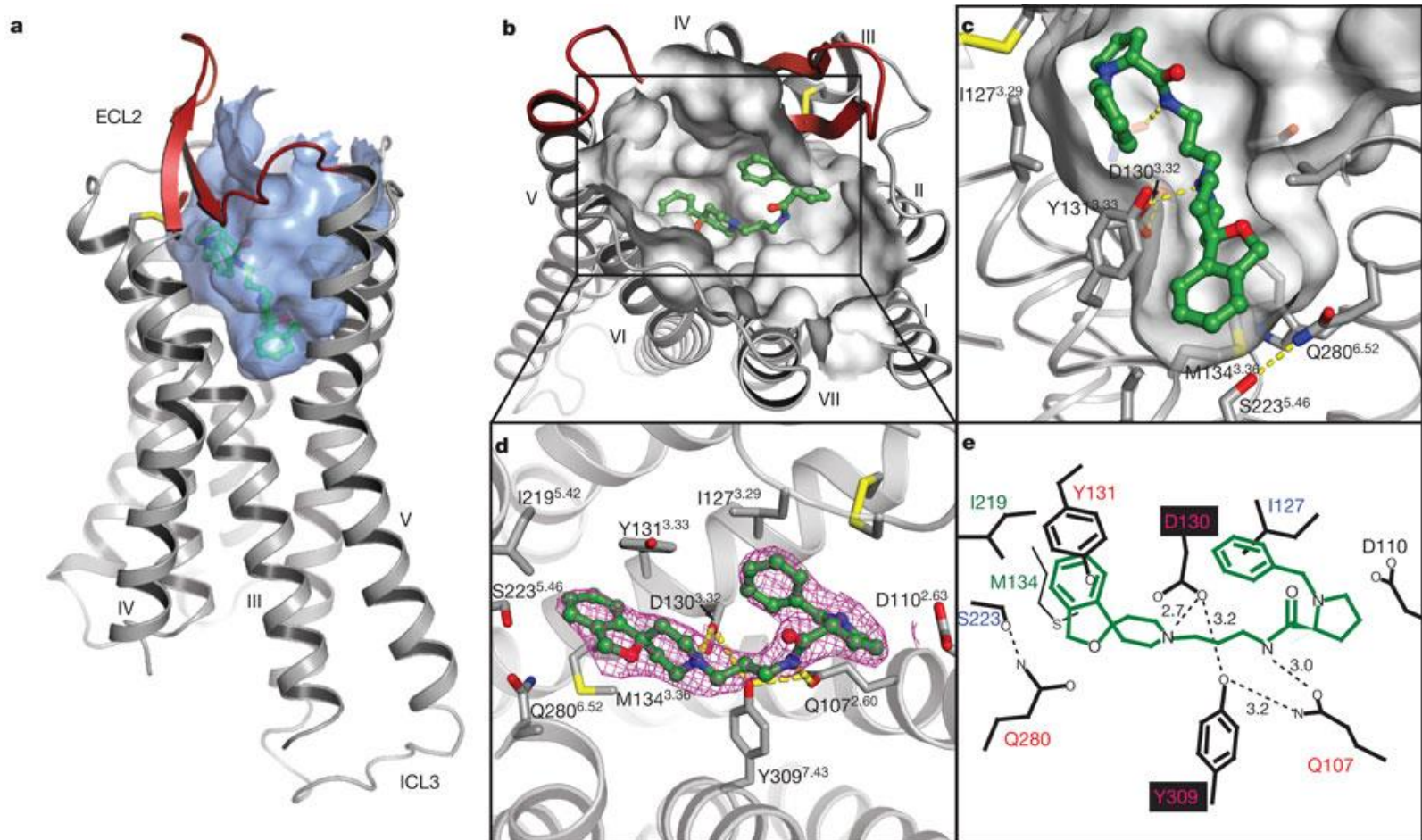


Fig. 3.1. La formazione di legami deboli è responsabile del processo di riconoscimento fra farmaco e recettore. La molecola A, a causa del moto termico, incontra casualmente altre molecole (in questo esempio B è una molecola solubile, C e D sono proteine intrinseche di membrana). Mentre con B e C si possono formare soltanto pochi legami deboli, che si scindono rapidamente, le superfici di A e D sono complementari fra loro nelle zone di contatto e si formano numerosi legami; in questo caso l'interazione è più duratura.

The orthosteric ligand-binding pocket



BOX 1: Esecuzione degli studi di *binding*

L'esecuzione di studi di *binding* comporta l'incubazione di una preparazione contenente il recettore in esame, anche non purificato, con un ligando di tale recettore (farmaco), marcato con un isotopo radioattivo, in condizioni di tempo, temperatura e pH controllati. Durante il periodo di incubazione, una porzione del ligando X forma con il recettore una certa quantità di complesso RX; al termine dell'incubazione, si separa con metodi opportuni X rimasto libero da RX, che naturalmente è anch'esso radioattivo, e si misura la radioattività associata al complesso farmaco-recettore. Dall'elaborazione dei dati di radioattività legata si possono ricavare i parametri caratteristici dell'interazione, più sopra descritti.

Il ligando, che può essere sia un agonista, sia un antagonista, deve essere marcato ad alta attività specifica (quindi con ^3H o ^{125}I , generalmente) per assicurare sensibilità alla metodica. Il tempo di incubazione deve essere sufficiente al raggiungimento dell'equilibrio, se i parametri che si cerca di determinare sono appunto quelli dell'equilibrio (K_d o B_{max}), oppure è variabile negli studi volti a determinare le caratteristiche cinetiche. La separazione del complesso RX dal ligando rimasto libero, X, si può eseguire con vari metodi, che non devono modificare la concentrazione di RX raggiunta. Nel caso di cellule intatte, o di recettori associati alla membrana cellulare, il metodo più usato consiste nel filtrare il campione alla fine dell'incubazione; le cellule (o membrane) e quindi il

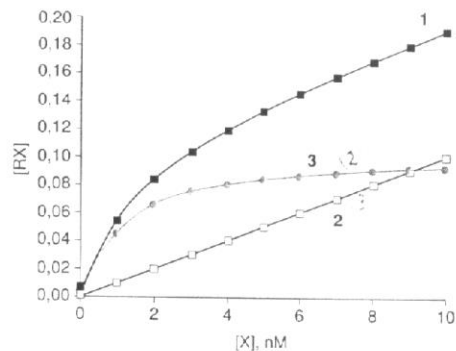


Fig. 1. Calcolo del legame specifico (2, curva colorata) a partire da legame totale (1, quadrati pieni) e legame non specifico (3, quadrati vuoti) in un esperimento di *binding* per saturazione. Ad es., curve di questo tipo si ottengono misurando il legame di ^3H -SCH23390 (ligando del recettore dopaminergico) da solo o in presenza di un eccesso di SCH23390 non radioattivo o di butaclamol, un composto che compete per lo stesso sito di legame.

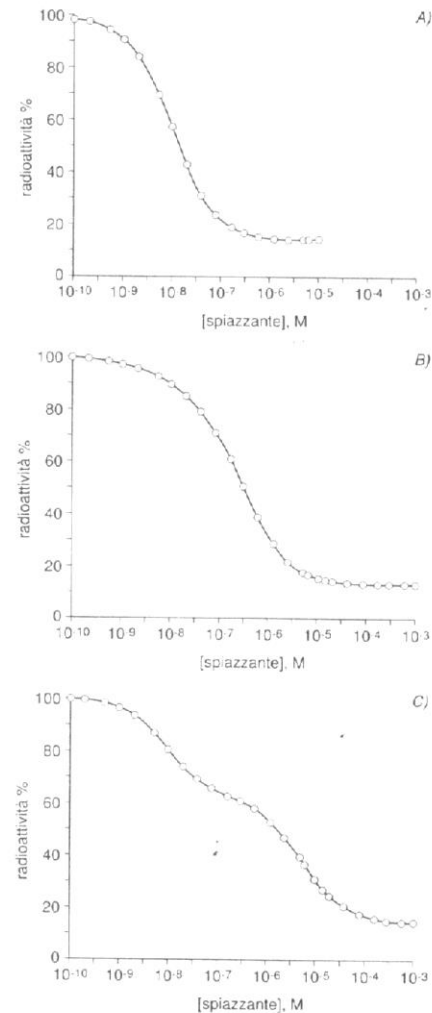


Fig. 2. Esperimento di *binding* per spiazzamento o competizione nel caso di una sola classe di recettori, A) $K_d = 10$ nM, o di due classi diverse, B) $K_d = 10$ e 300 nM, $B_{\text{max}} = 18$ e 82%; C) $K_d = 10$ e 5000 nM, $B_{\text{max}} = 44$ e 56%. Ad es., si ottengono curve di questo tipo eseguendo un esperimento di *binding* con ^3H -DHA (ligando non selettivo dei recettori β), spiazzato da atenolo, selettivo per i recettori β_1 , in un tessuto che contenga soltanto recettori β_1 (grafico A) o una popolazione mista di recettori β_1 e β_2 (grafico B). La situazione di C) si otterrebbe soltanto con uno spiazzante che mostri una selettività β_1/β_2 maggiore dell'atenolo.

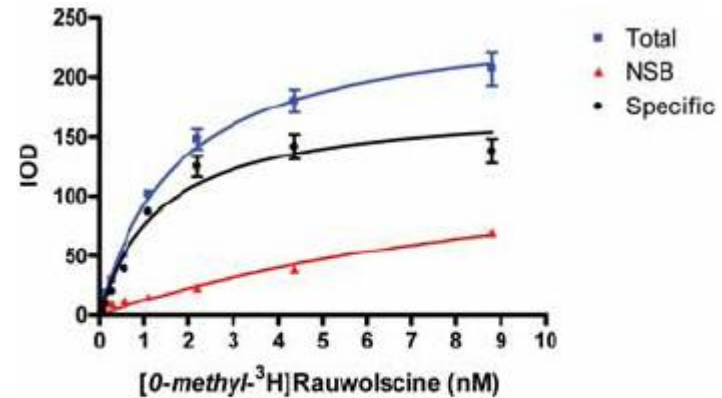
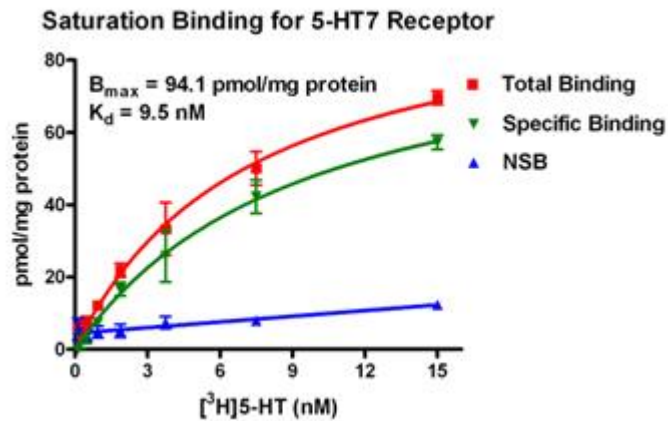
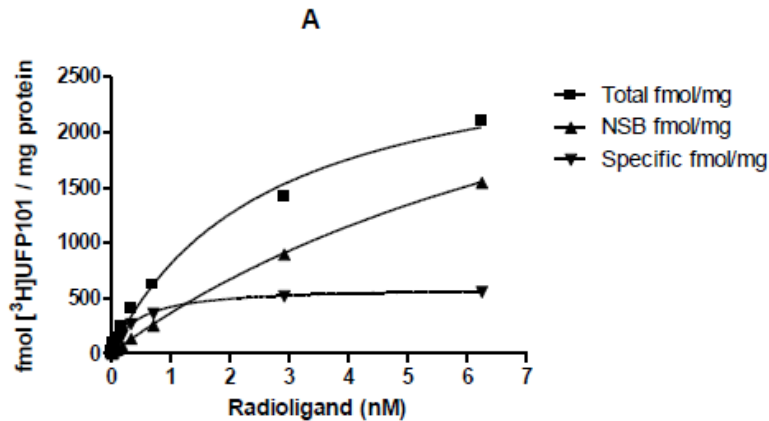


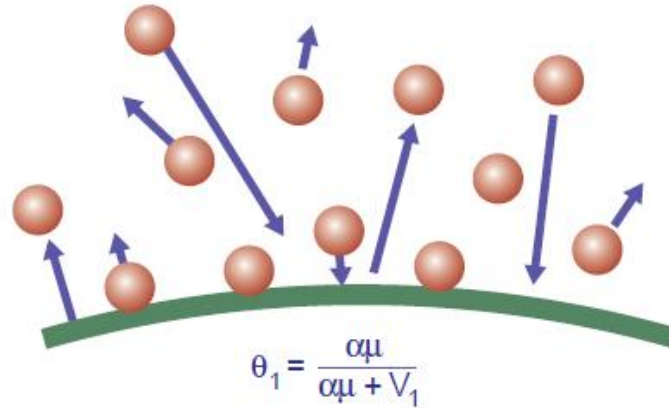
Fig 1. Dilutions of [0-methyl-³H]Rauwolscine were prepared to provide concentrations ranging from 0.07 to 8.8 nM in the well. Data points on the curves are the mean of three replicates $\pm$ SD.



Radioligand

H vs I

Langmuir adsorption isotherm



$$\rho = \frac{[AR]}{[R_t]} = \frac{[A]}{[A] + K_A}$$

The same formula has been adapted by pharmacologists to measure ligand/receptor association/dissociation properties

Irving Langmuir was interested in quantifying the adsorption of molecules to metal filaments for the production of light.

binding procedures

Membranes from cells -
tissue extracts

Receptor levels ($B_{\max}$)

Ligand affinity (K_D/K_i)

Kinetics of binding ($K_{\text{on}}/K_{\text{off}}$)

Intact cells -
tissue slice

Receptor localization/distribution

Receptor internalization ($\Delta B_{\max}$)

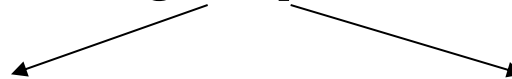
membrane preparation/homegenisation

cells seeding/slice preparation

incubation with labelled/cold ligand

filtration/inactivation

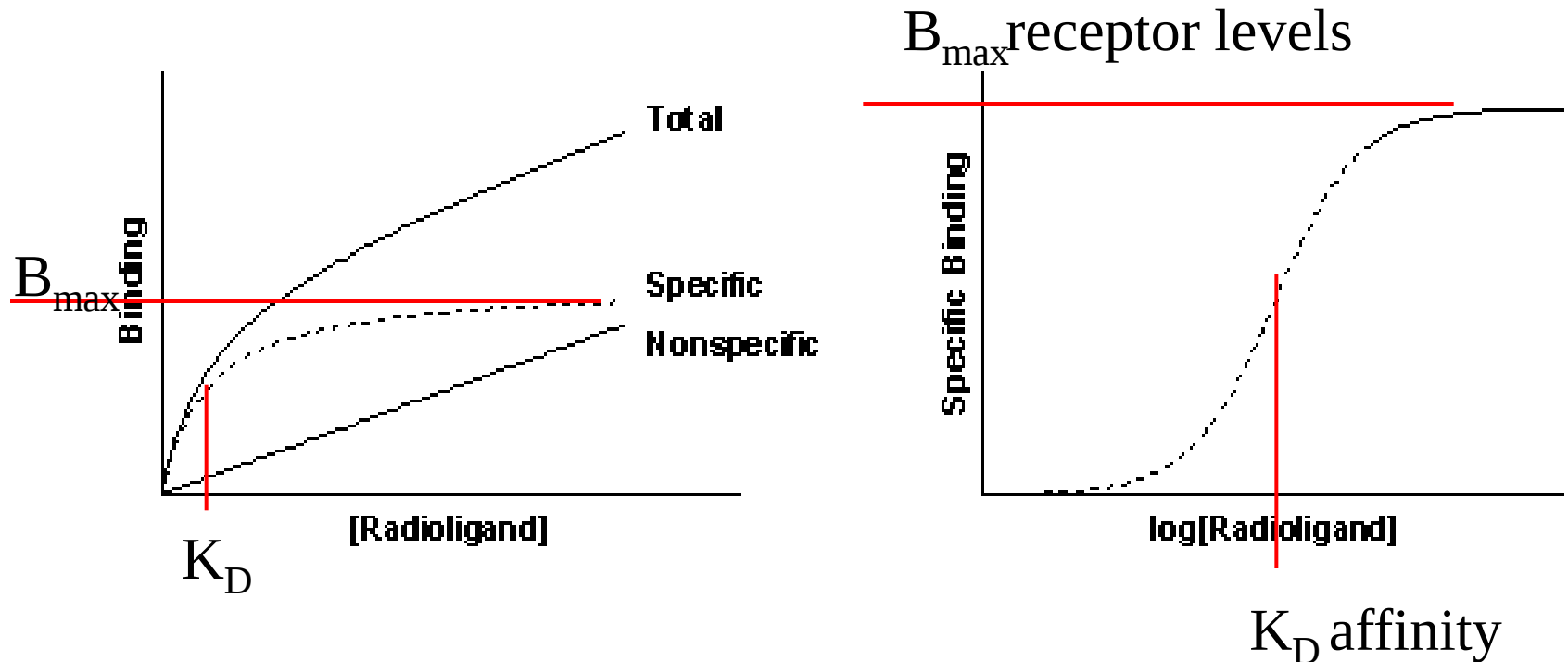
labelled ligand quantification



quantification of labelled bound ligand

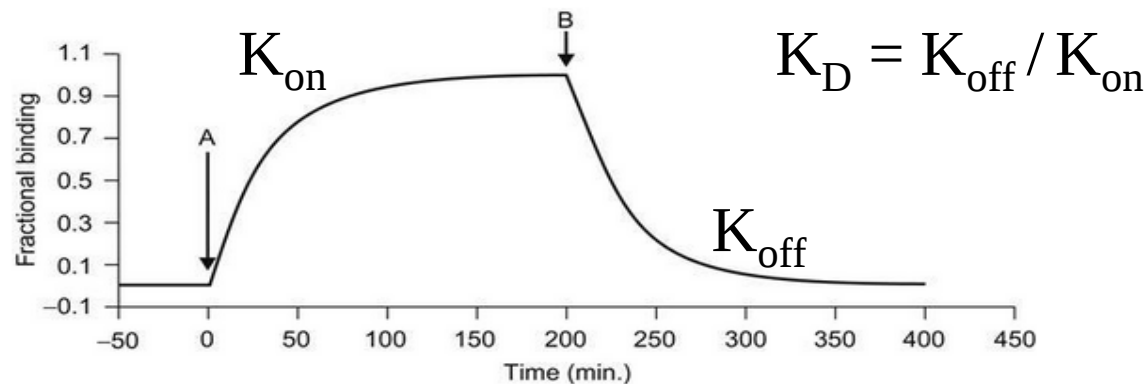
visualization of labelled bound ligand

saturation binding



onset / offset of receptor ligands

Time course for the onset of a radioligand onto the receptor and the reversal of radioligand binding upon addition of cold ligand

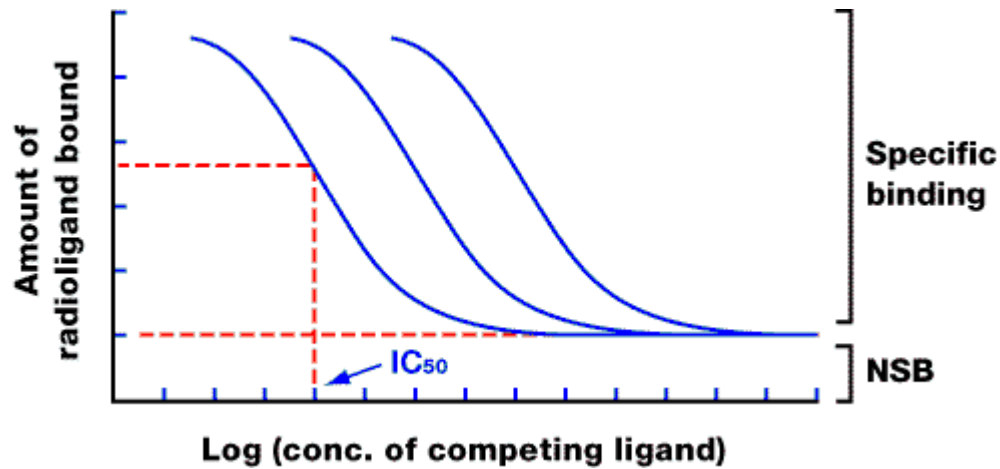


Useful assay to measure the obtaining of the “steady state”

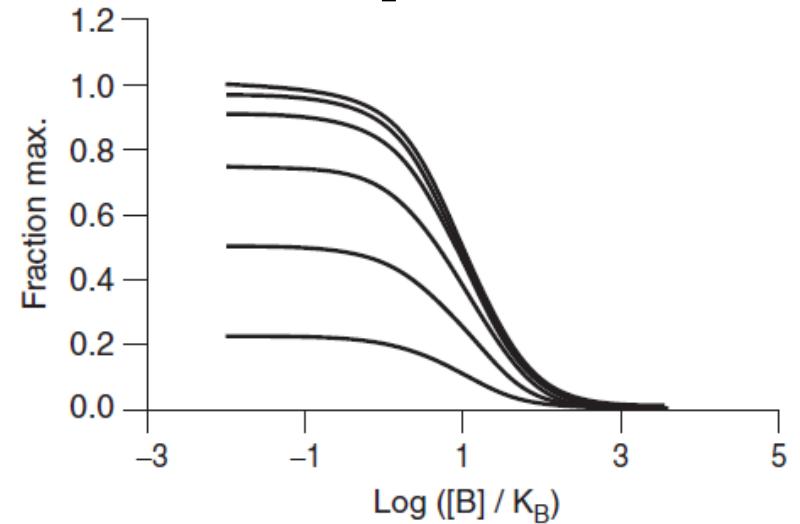


displacement binding

competitive



non competitive



$$pK_i = \log \left[\frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \right]$$

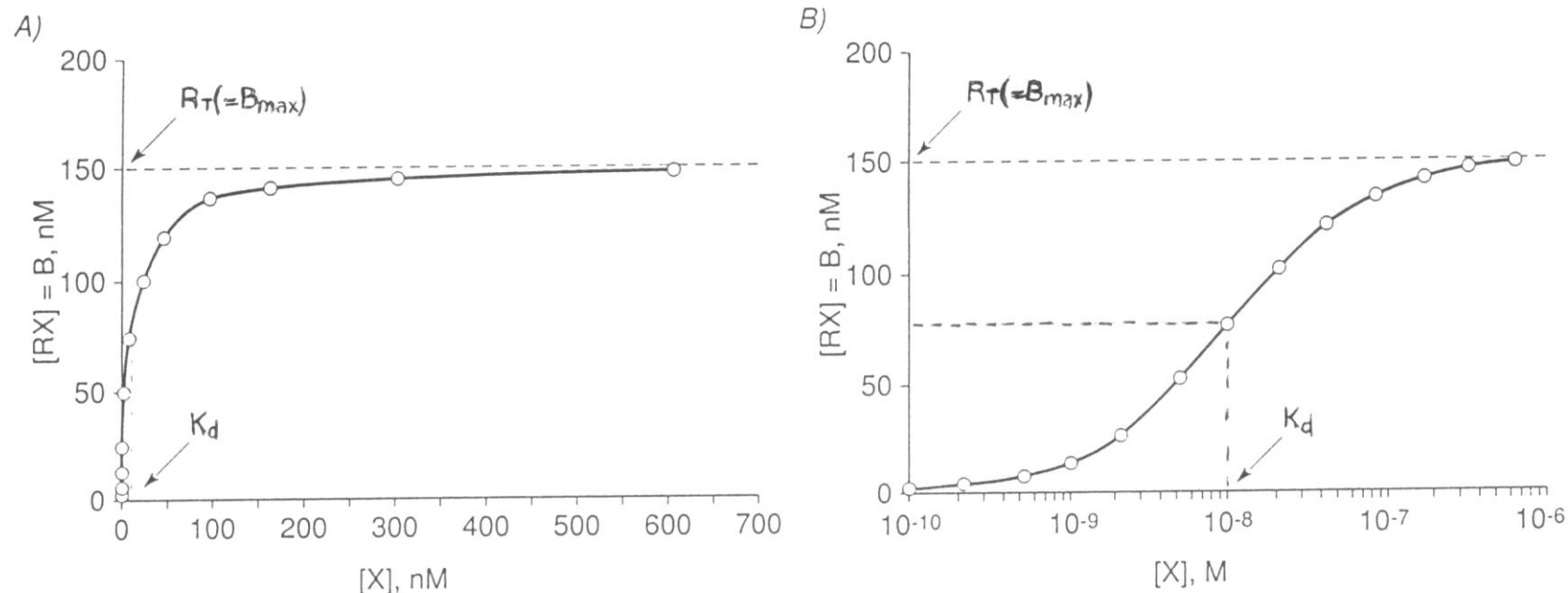


Fig. 3.2. Isoterma di legame: concentrazione del complesso farmaco-recettore (RX o B) in funzione della concentrazione del farmaco libero (X). In questo esempio, $K_d = 10$ nM e $R_T = B_{max} = 150$ nM. B_{max} si ottiene dal valore del plateau a cui la curva tende asintoticamente; K_d è pari alla concentrazione di farmaco che provoca la saturazione del 50% dei recettori presenti. In A): grafico in scala aritmetica; in B): gli stessi dati di A) in scala semilogaritmica.

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}}$$

X is the logarithm of concentration. Y is the response

Y starts at Bottom and goes to Top with a sigmoid shape.

This is identical to the "four parameter logistic equation"

Interazioni farmaco-recettore e risposta quantitativa ai farmaci

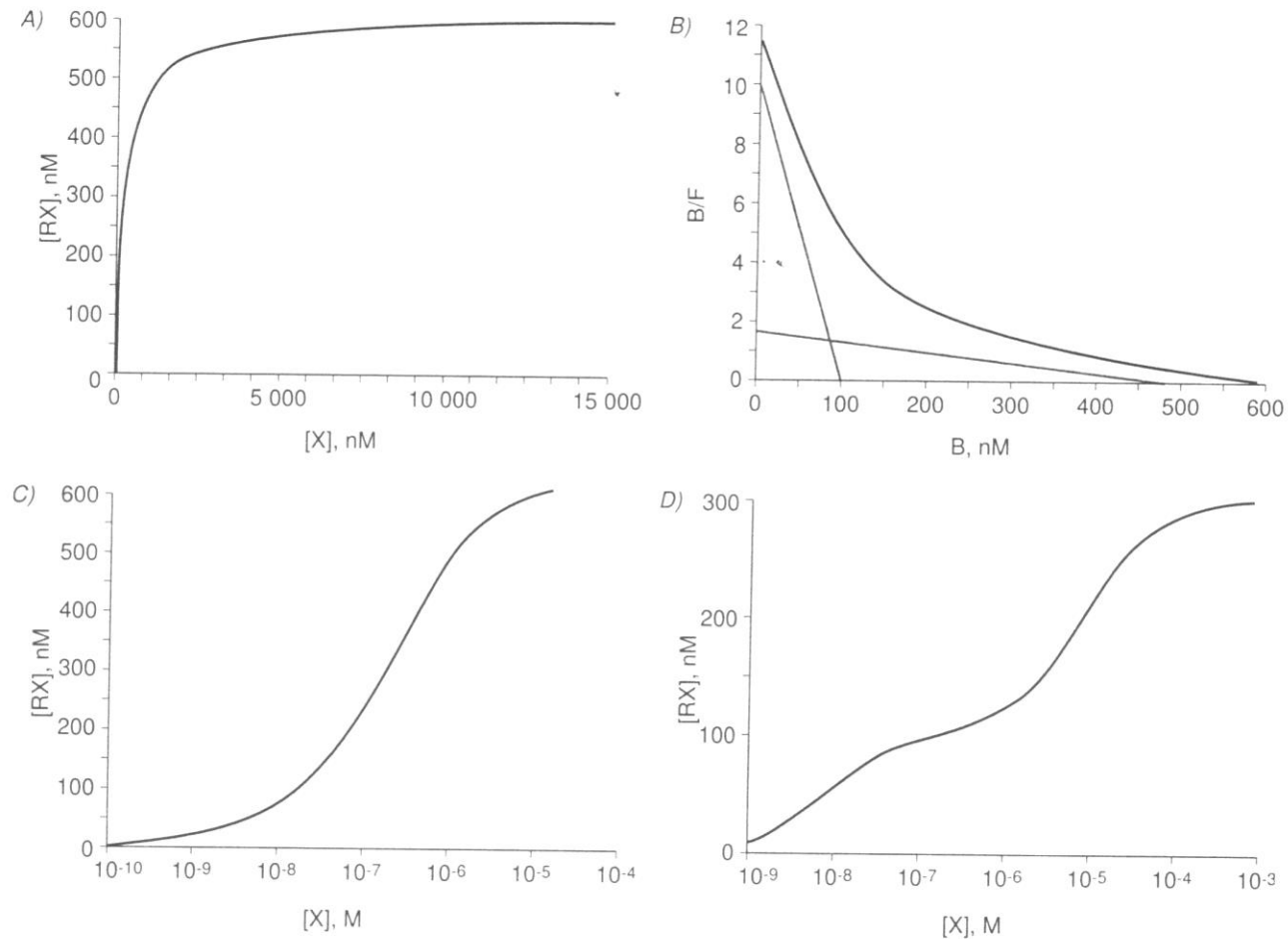
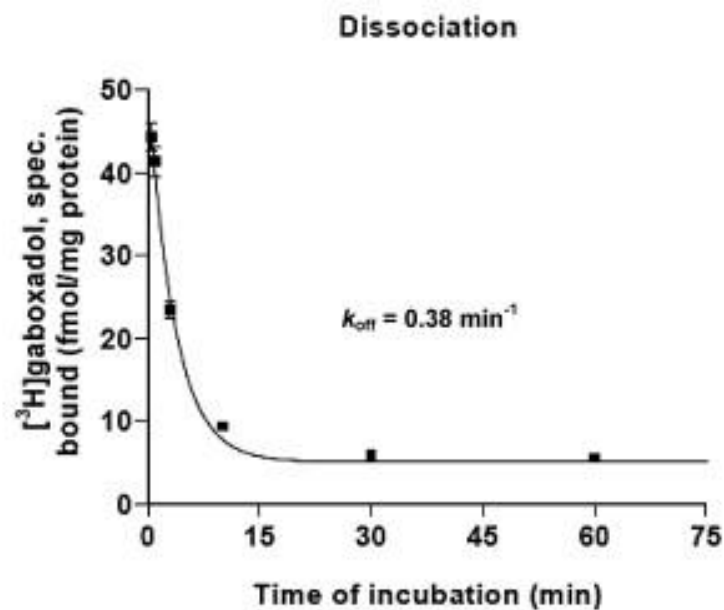
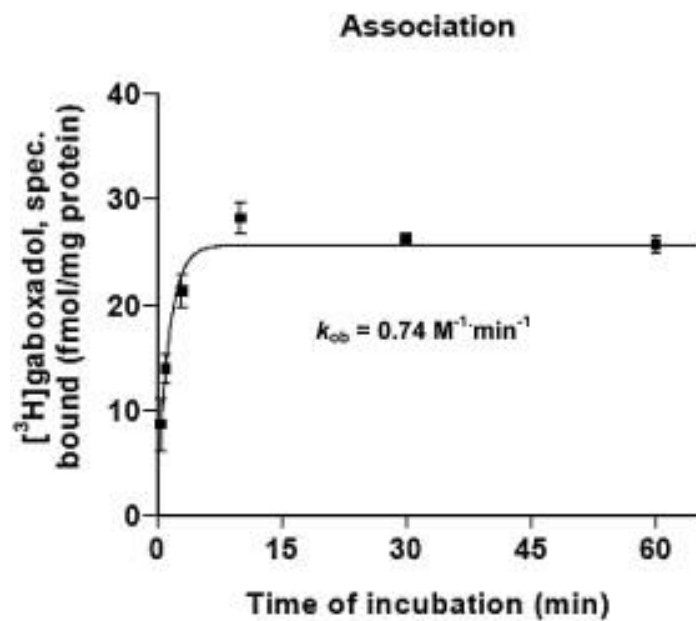
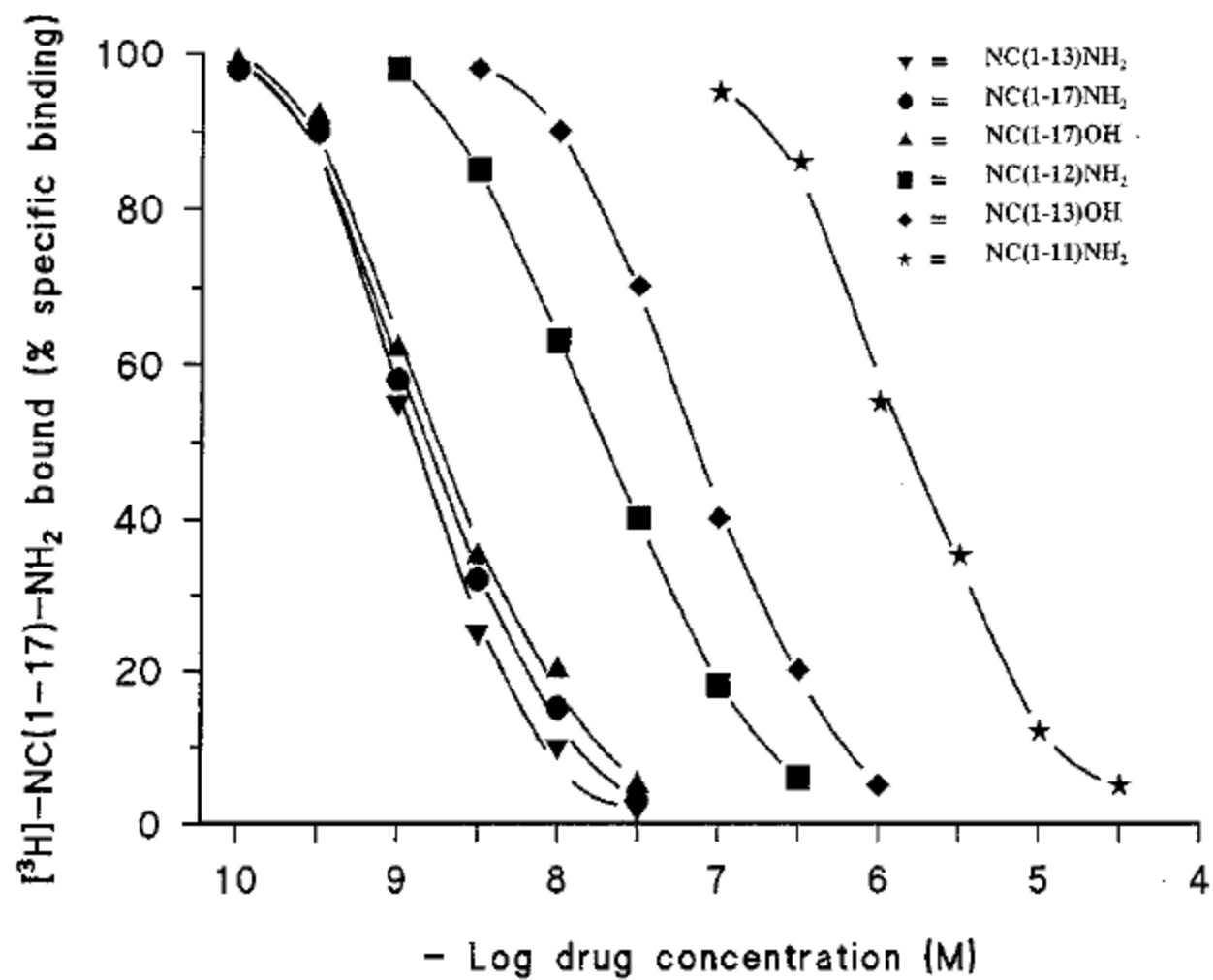
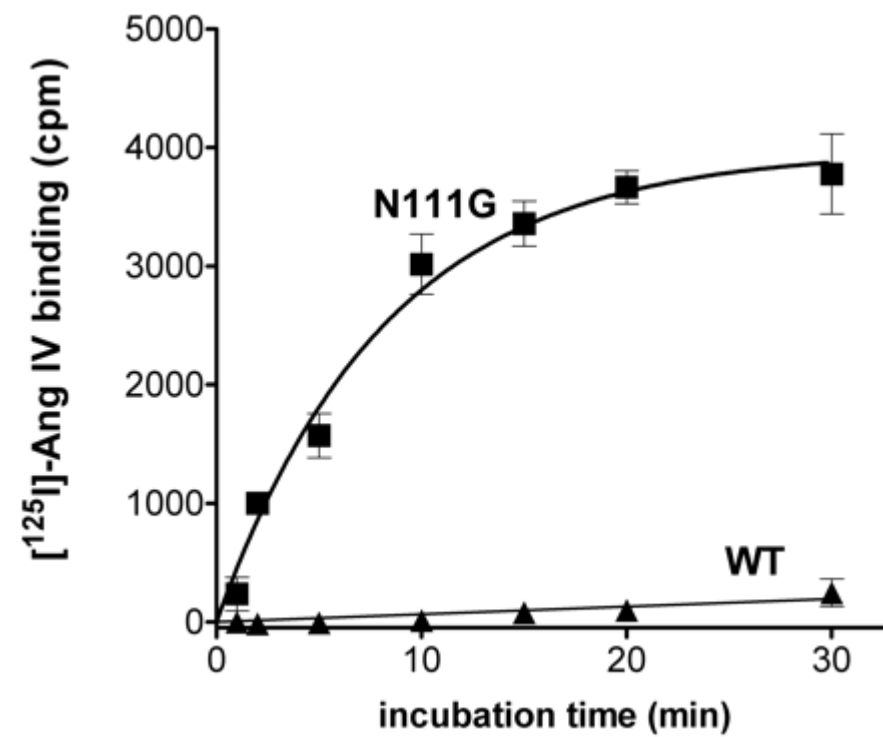


Fig. 3.4. Isotherma di legame e grafico di Scatchard nel caso di interazione di un farmaco con due classi di recettori. Un esempio di questo tipo si può ottenere eseguendo un esperimento di *binding* con un farmaco abbastanza selettivo per i recettori β_1 (ad es. atenololo) in un tessuto, come la corteccia cerebrale di ratto, che possiede sia recettori β_1 sia recettori β_2 . A) Grafico in scala aritmetica; B) grafico di Scatchard e C) grafico semilogaritmico relativi ad un farmaco abbastanza selettivo nei confronti dei due sottotipi recettoriali. I parametri sono i seguenti: K_d per il recettore 1 = 10 nM, K_d per il recettore 2 = 300 nM; B_{max} del recettore 1 = 100 nM, B_{max} del recettore 2 = 500 nM. Si noti come solo con il grafico di Scatchard si possa apprezzare la presenza dei due siti di legame per il farmaco aventi affinità diversa: infatti nel grafico B) i dati sperimentali disegnano una curva che è scomponibile nelle due rette colorate da cui è possibile ricavare i valori di K_d dei due siti di legame. Se nel tessuto esistono siti di legame con K_d enormemente diverse ($K_{d1} = 10$ nM, $K_{d2} = 10.000$ nM) la loro presenza può essere già notata in un grafico semilogaritmico (D) per la comparsa di un flesso nella curva.

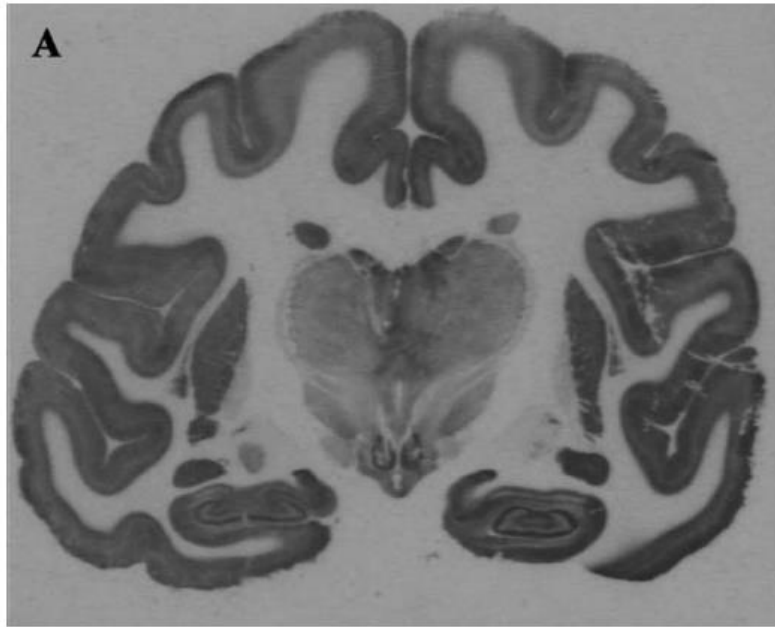






specificity of $^{125}\text{I}[\text{Tyr}^{14}]\text{N/OFQ}$ in monkey brain tissues

0.1 nM $^{125}\text{I}[\text{Tyr}^{14}]\text{N/OFQ}$



Specificity of signal and level of non-specific binding was determined by incubation of adjacent sections with 0.1 nM labelled N/OFQ in the presence of excess unlabeled N/OFQ (1 μM) which abolished specific signal

NOP receptor distribution/quantification

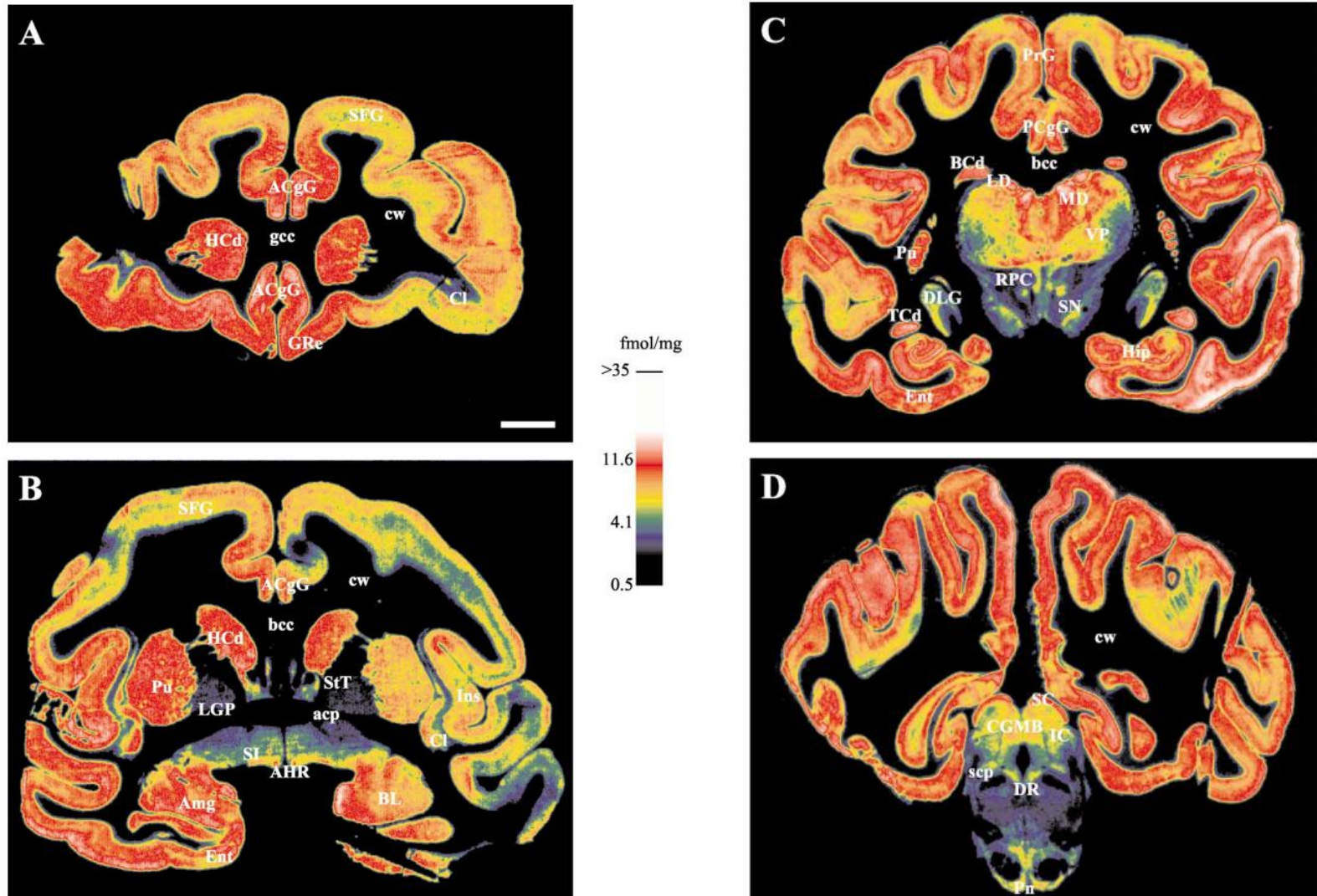


TABLE 4.2 Criteria for Binding Experiments

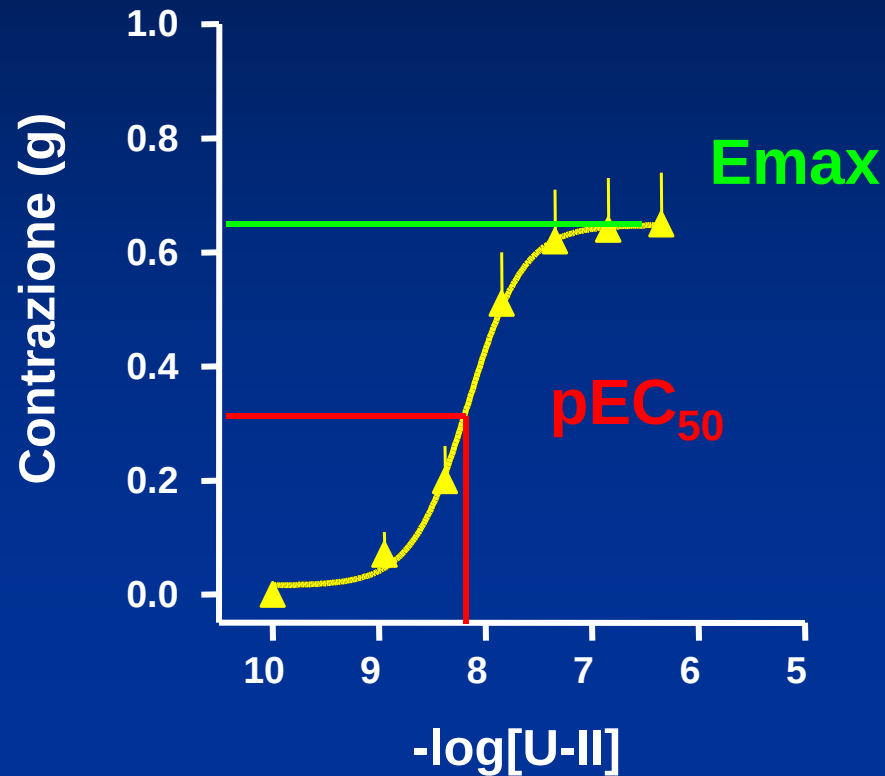
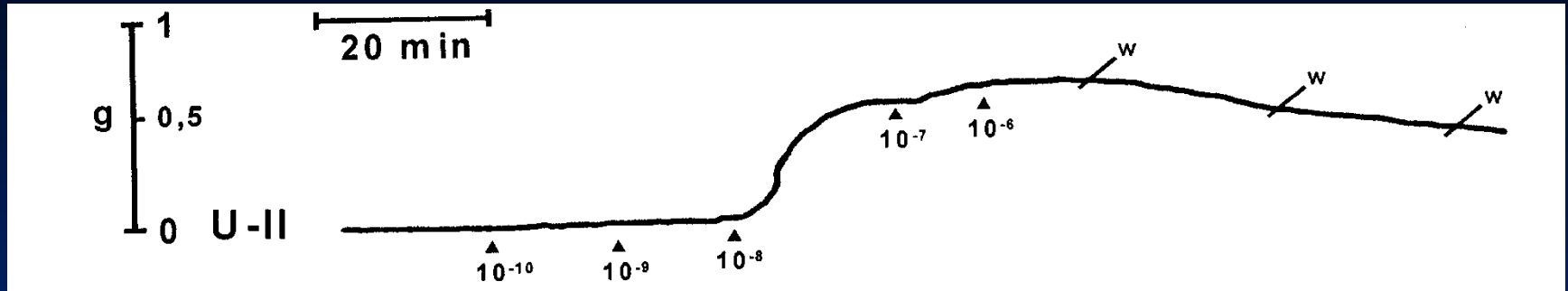
Minimal criteria and optimal conditions for binding experiments:

- The means of making the ligand chemically detectable (i.e., addition of radioisotope label, fluorescent probe) does not significantly alter the receptor biology of the molecule.
- The binding is saturable.
- The binding is reversible and able to be displaced by other ligands.
- There is a ligand available to determine nonspecific binding.
- There is sufficient biological binding material to yield a good signal-to-noise ratio but not too much so as to cause depletion of the tracer ligand.

For optimum binding experiments, the following conditions should be met:

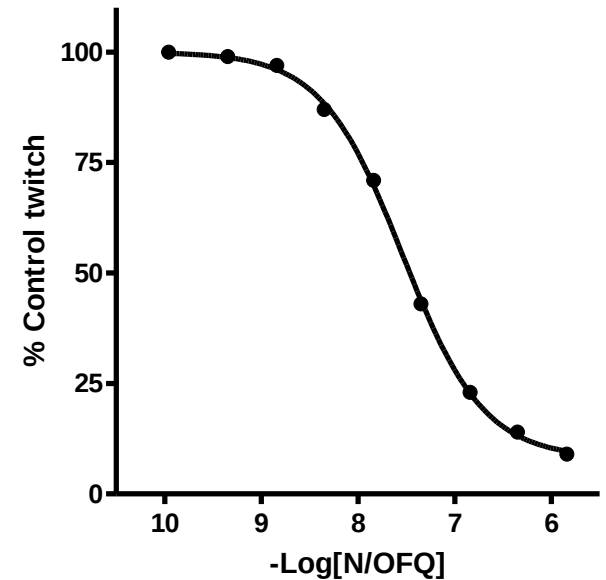
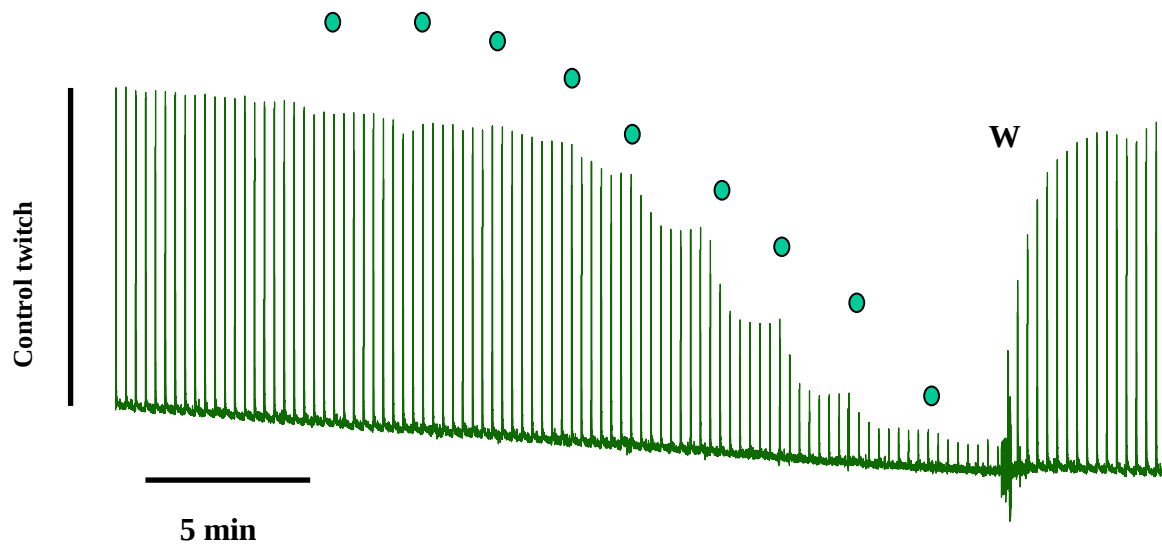
- There is a high degree of specific binding and a concomitantly low degree of nonspecific binding.
- Agonist and antagonist tracer ligands are available.
- The kinetics of binding are rapid.
- The ligand used for determination of nonspecific binding has a different molecular structure from the tracer ligand.

Effects of hU-II in rat aorta strips



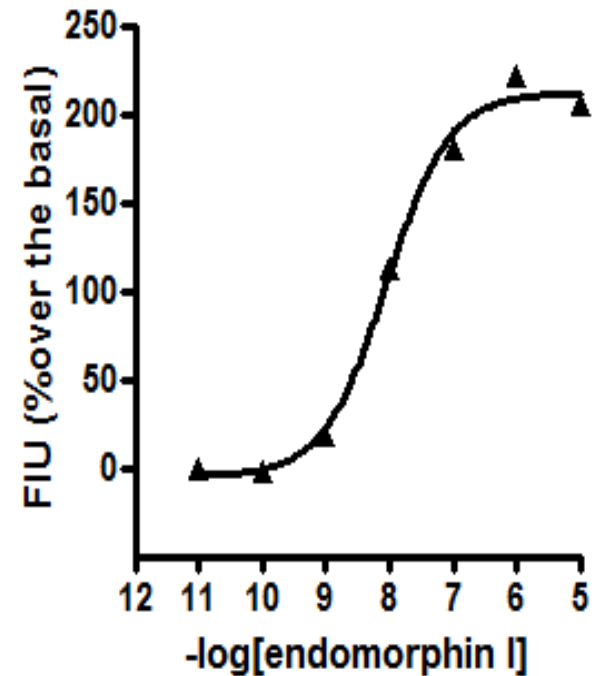
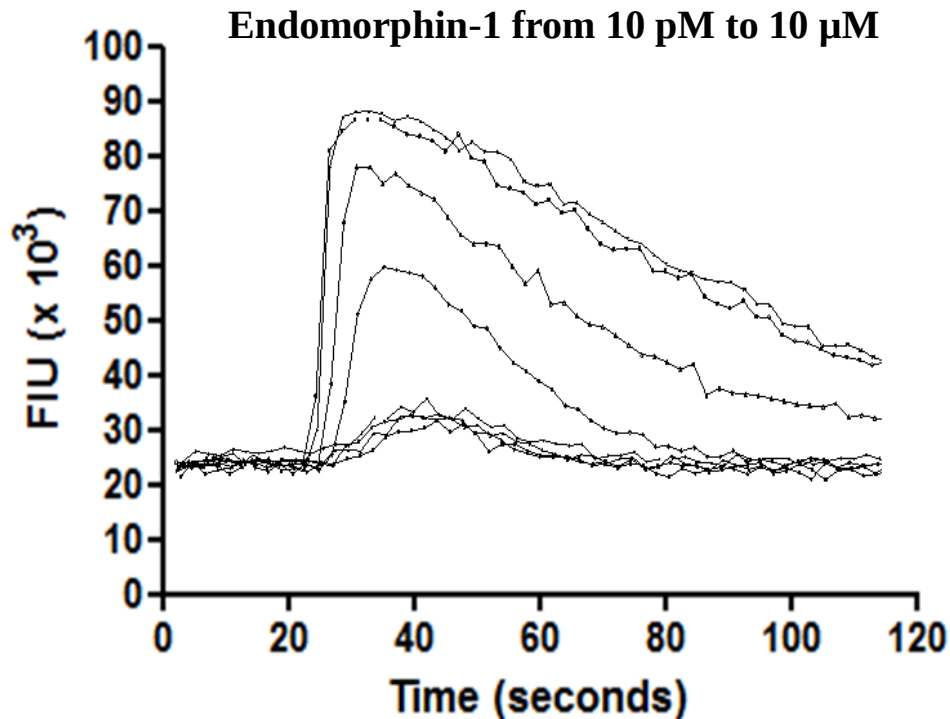
mVD / NOP receptor

Single representative experiment of the concentration-response curve to N/OFQ

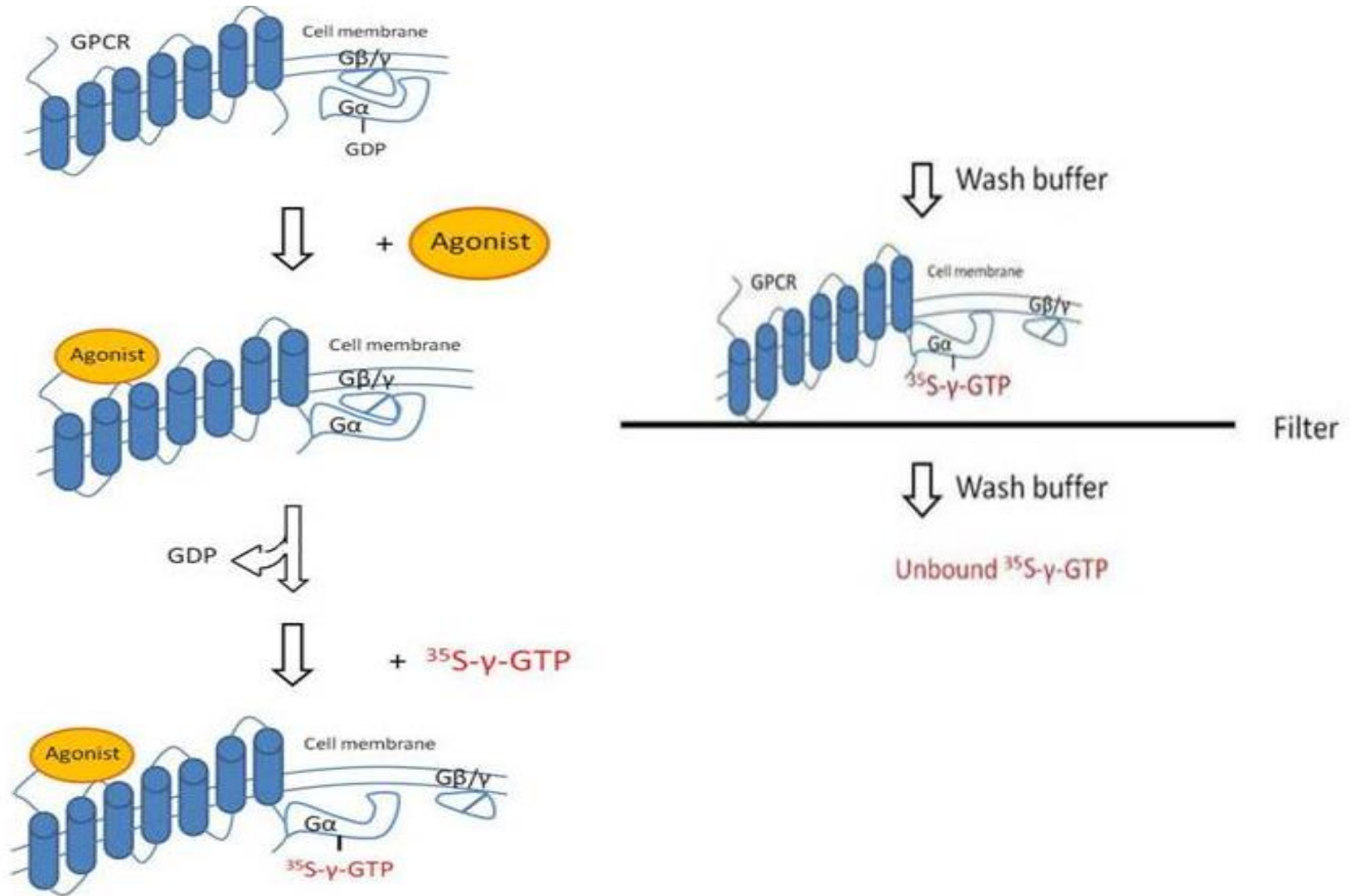


CHO - $G\alpha_{qi5}$ / MOP receptor

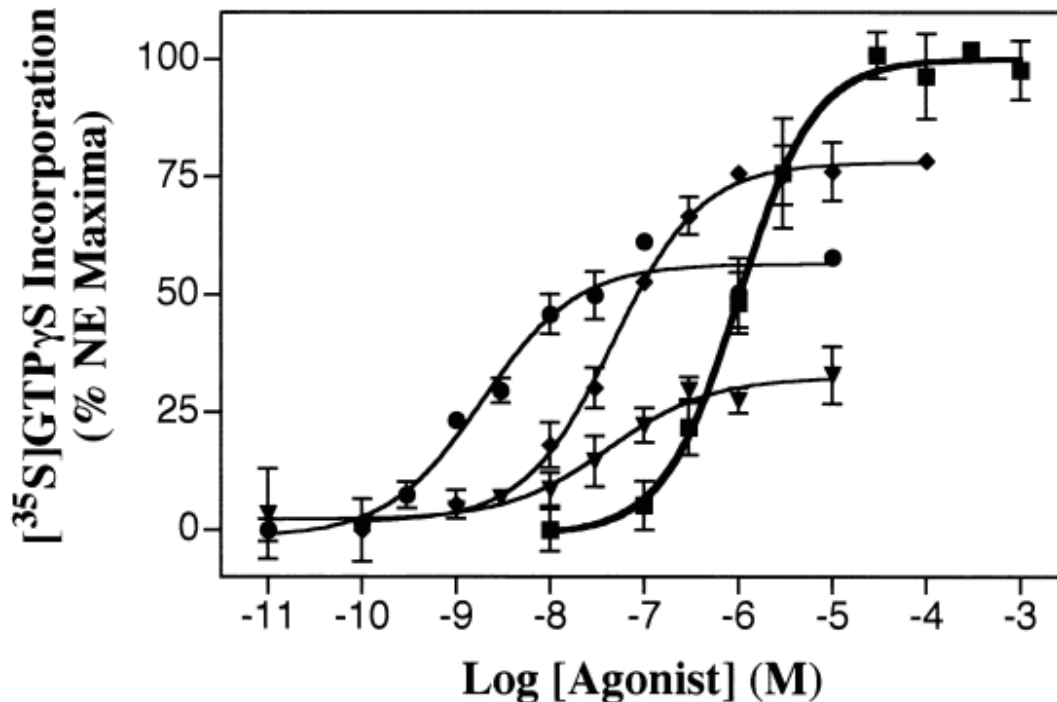
Single representative experiment of the concentration-response curve to endomorphin-1



$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding as functional assay



[³⁵S]GTP γ S binding as functional assay



Alpha-2 adrenoceptor mediated stimulation of [³⁵S]GTP γ S binding to G-proteins in HEK293 cell membranes expressing the mouse $\alpha_{2a/d}$ AR. Membranes were incubated for 60 min at room temperature with increasing concentrations of the agonists Norepinephrine (■), UK-14304 (◆), dexmedetomidine (●), and clonidine (▼):

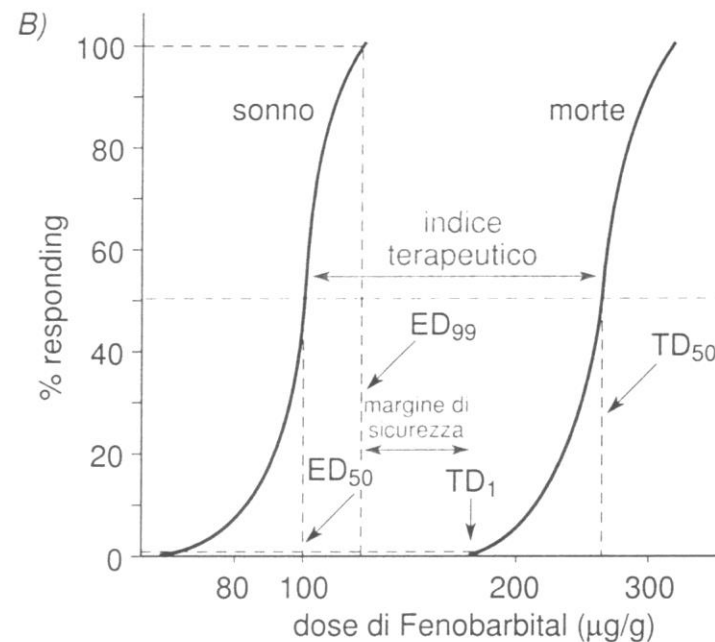
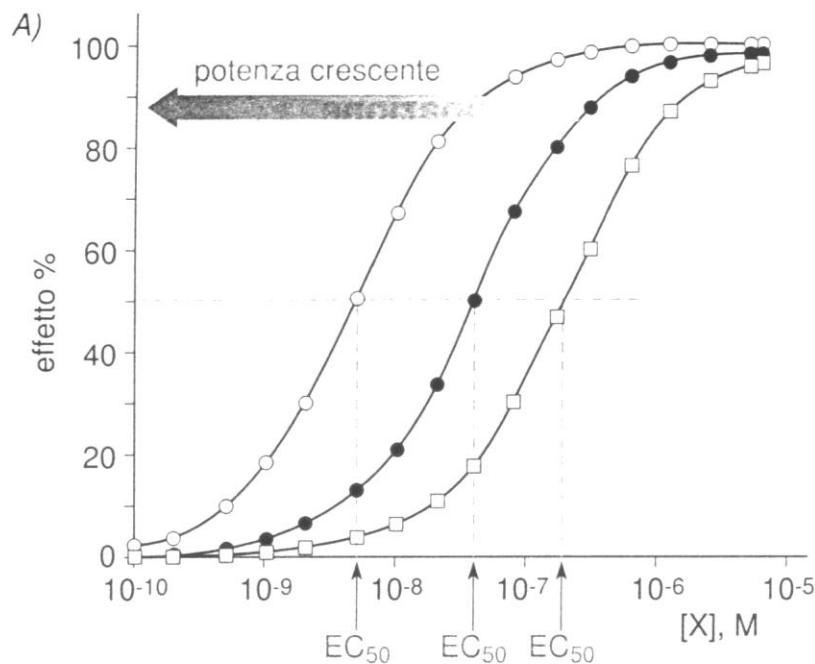
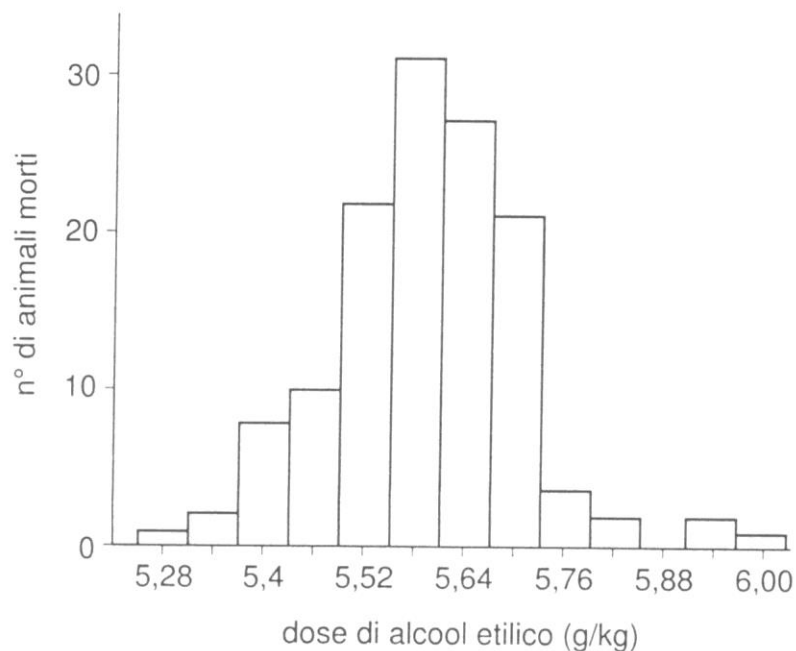


Fig. 3.7. Curve dose-risposta in scala semilogaritmica. A) Curve di farmaci con potenza diversa; un esempio di questo tipo potrebbe essere costituito dal rilassamento della muscolatura bronchiale da parte di farmaci beta-adrenergici. EC₅₀ = 5 nM (tondini vuoti), 40 nM (tondini pieni) e 200 nM (quadrati vuoti). B) Lo stesso farmaco (nell'esempio: fenobarbital) può avere più di un effetto, con curve dose-risposta separate; un effetto può essere quello desiderato (induzione del sonno), mentre un altro può essere un effetto tossico (morte). È mostrato anche come si esegue il calcolo dell'indice terapeutico (TD₅₀/ED₅₀) e del margine di sicurezza (TD₁/ED₉₉).

$$\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}e^{-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2}}.$$

A)



B)

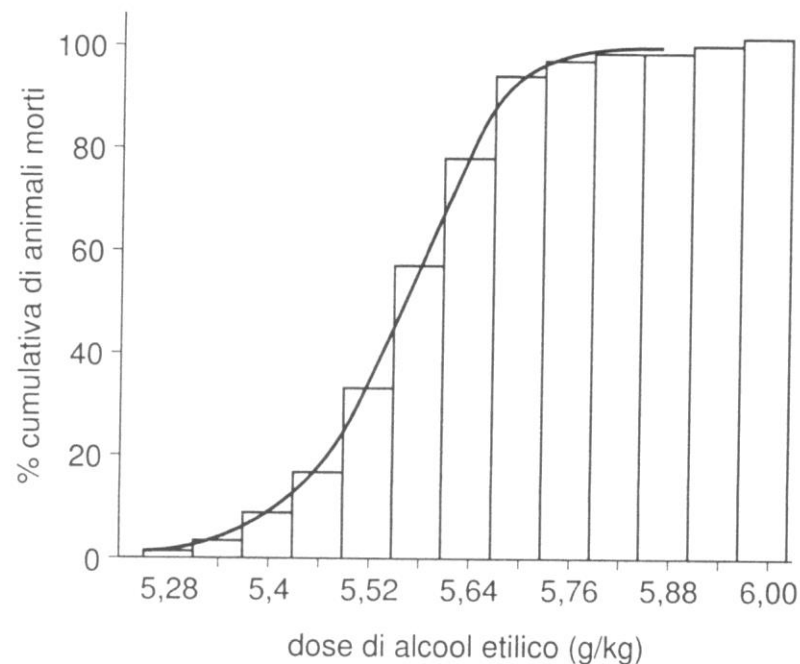


Fig. 3.6. Curve dose-risposta in una popolazione: effetto letale di dosi crescenti di alcool etilico. Dosi crescenti di alcool etilico venivano somministrate a ciascun animale, e si registrava il numero di animali che morivano a ciascuna dose (A): istogramma delle frequenze; solo pochi animali sopravvivevano fino a dosi di 5,7 g/kg. B) Curva cumulativa ottenuta dalla precedente calcolando per ciascuna dose la percentuale di animali che morivano rispetto al numero totale, e sommando tale percentuale alla percentuale relativa a tutte le dosi inferiori a quella considerata. La curva cumulativa mostra quindi la percentuale di soggetti in cui compare, al variare della dose, l'effetto misurato.

Recettori e trasduzione del segnale

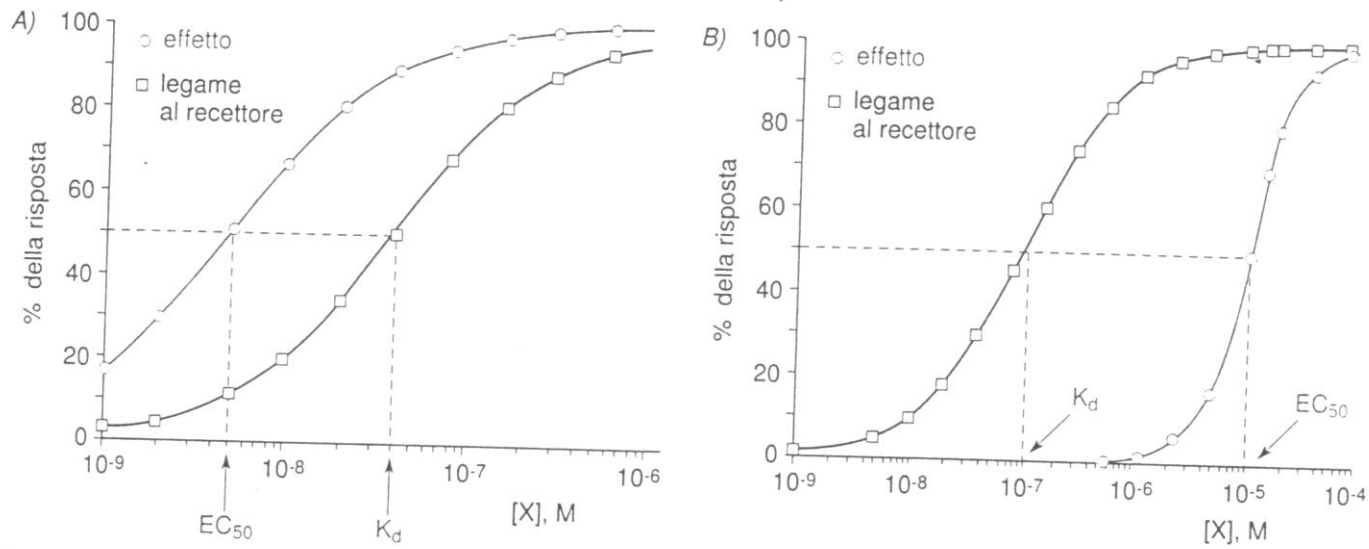


Fig. 3.8. Separazione fra curva dose-risposta e curva di interazione farmaco-recettore nel caso di esistenza di recettori di riserva (A) o di soglia di occupazione (B).

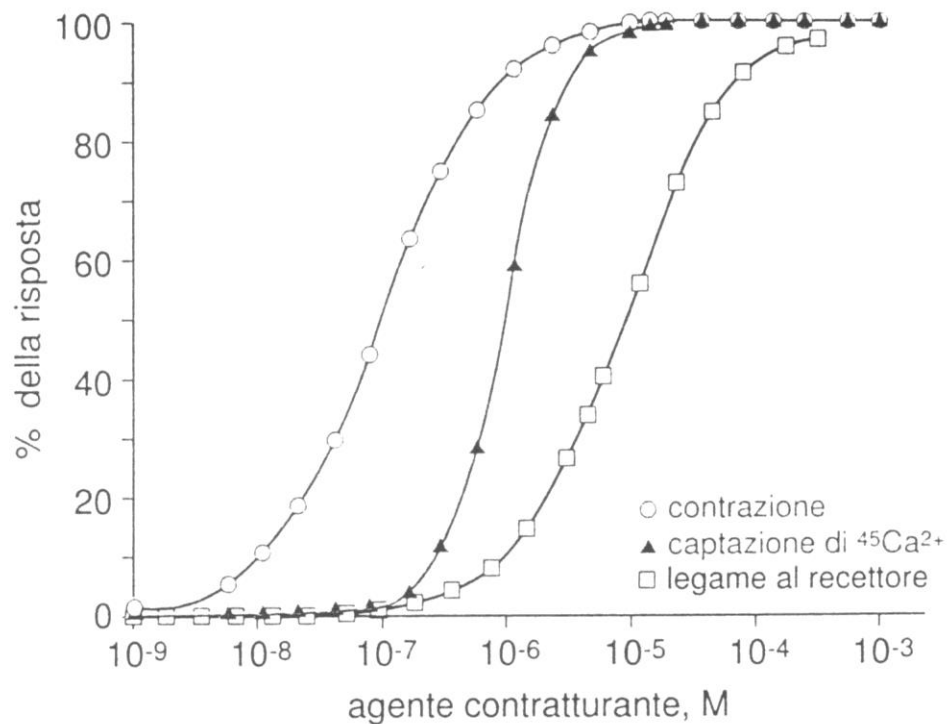


Fig. 3.10. La curva dose-risposta può essere spostata sull'asse delle X e/o avere pendenza o forma diverse rispetto alla curva dose-legame (curva nera). Per uno stesso farmaco, posizione, pendenza e forma della curva dose-effetto può variare se vengono presi in considerazione effetti diversi, in questo caso aumento della captazione di Ca^{2+} radioattivo e contrazione.

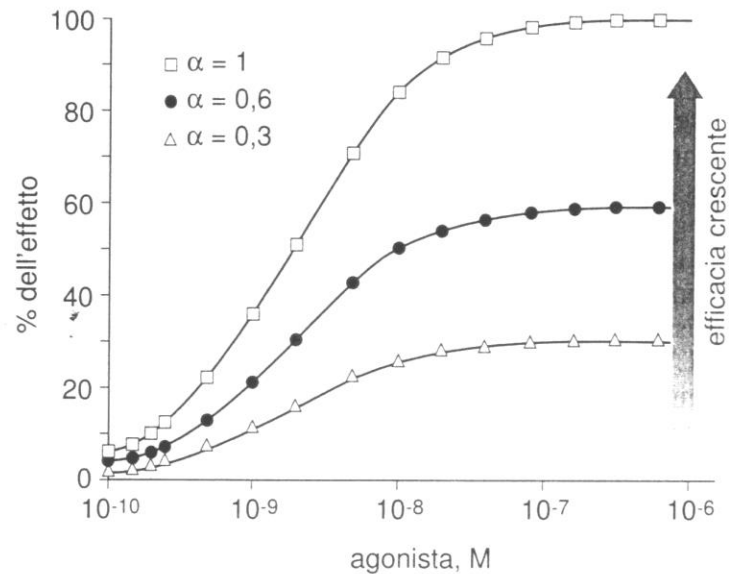


Fig. 3.13. Curve dose-risposta per un agonista pieno (quadrato vuoto) e per agonisti parziali (punti pieni e triangoli vuoti). I valori di α = attività intrinseca sono indicati nella figura. Fenoldopam è un esempio di agonista parziale: rilassa i vasi sanguigni di molti distretti, ma il suo effetto massimo è minore di quello della dopamina, attraverso il cui recettore agisce.

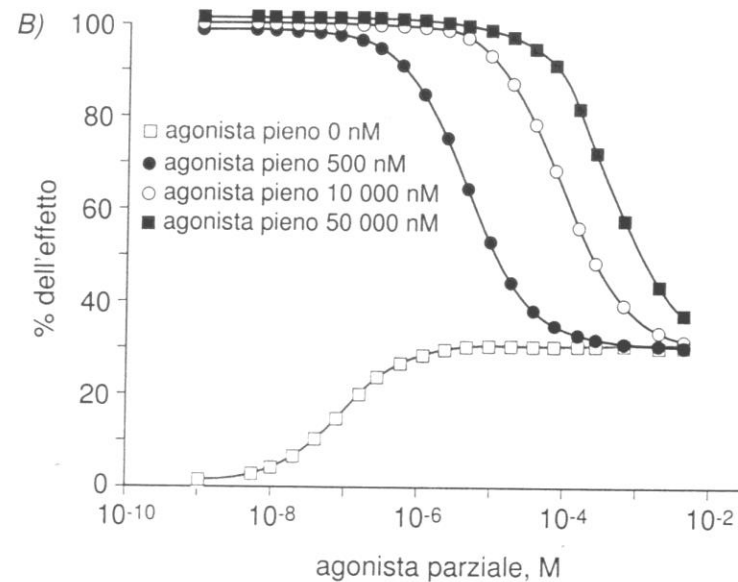
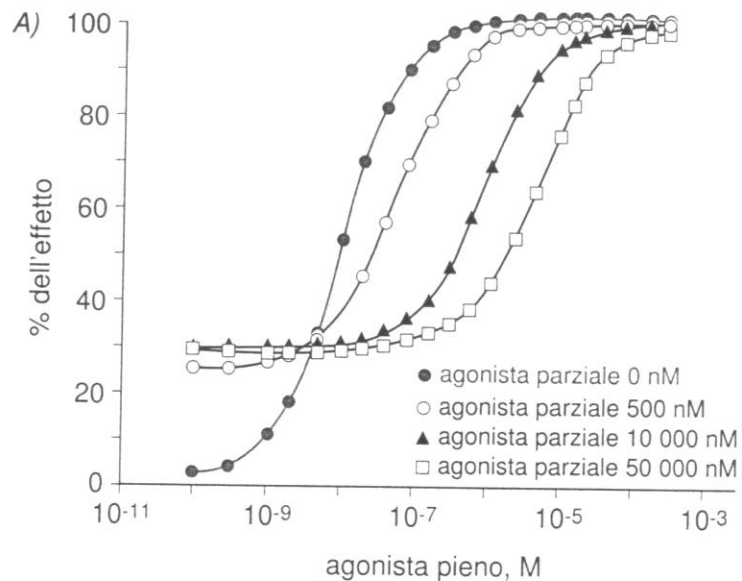
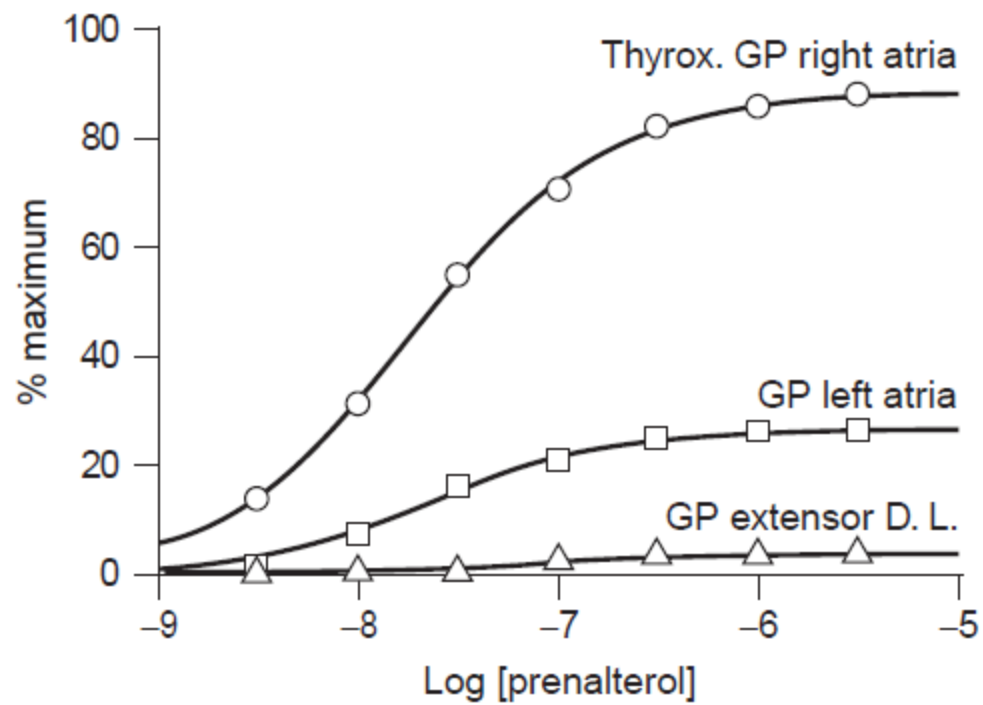
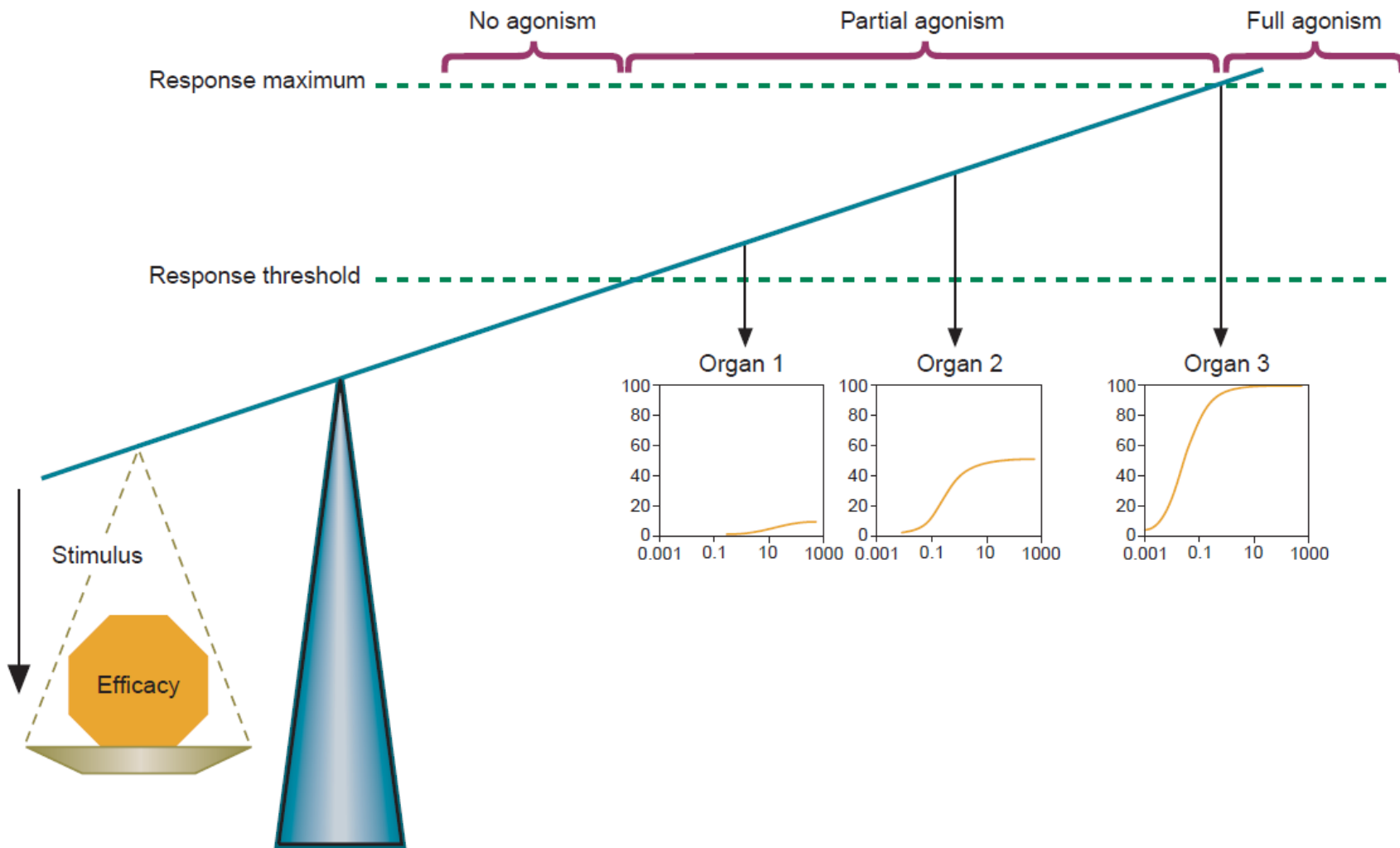


Fig. 3.14. Curve dose-risposta per un agonista pieno (A) in presenza di concentrazioni crescenti di un agonista parziale e di un agonista parziale (B) in presenza di concentrazioni crescenti di agonista pieno. In questo esempio $\alpha = 0,3$, $EC_{50} = 10$ nM per l'agonista pieno e 100 nM per l'agonista parziale.





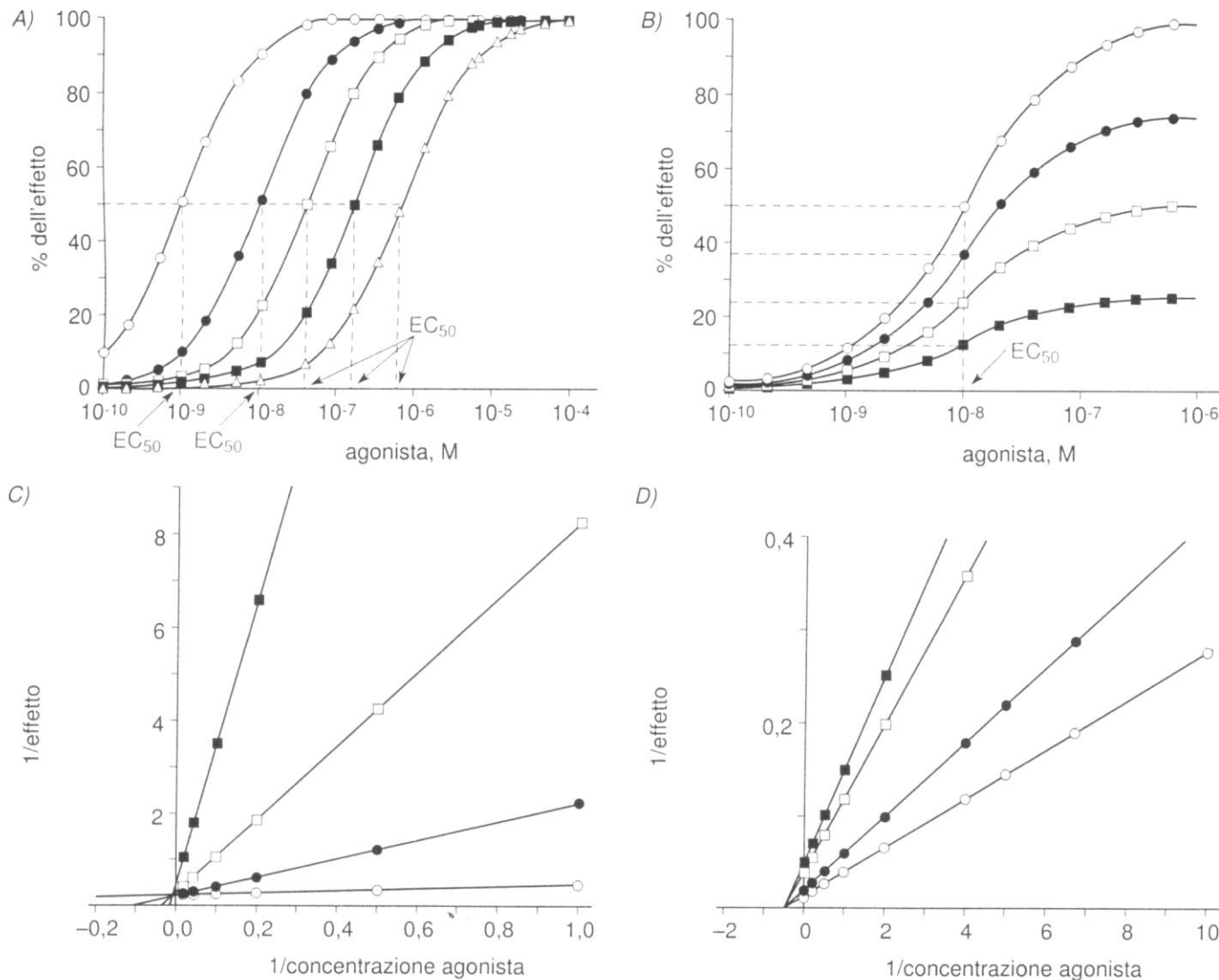


Fig. 3.11. Modificazione della curva dose-risposta di un agonista (es., acetilcolina) in presenza di concentrazioni crescenti di un antagonista sormontabile (es., atropina, in A) o insormontabile (es., gallamina, in B). I grafici C) e D) rappresentano la trasformazione dei due gruppi di dati nel grafico doppio-reciproco o di Lineweaver-Burk. I parametri utilizzati sono i seguenti: in A) e C), $K_d = 1$ nM costante di dissociazione dell'agonista; $K_a = 0,1$ nM costante di dissociazione dell'antagonista; concentrazioni dell'antagonista: 0 (tondini vuoti), 1 (tondini pieni), 4 (quadrati vuoti), 16 (quadrati pieni) e 64 (triangoli) nM. In B) e D), $K_d = 10$ nM, concentrazioni dell'antagonista tali da inattivare rispettivamente 0 (tondini vuoti), 25 (tondini pieni), 50 (quadrati vuoti) e 75 (quadrati pieni) % dei recettori presenti.

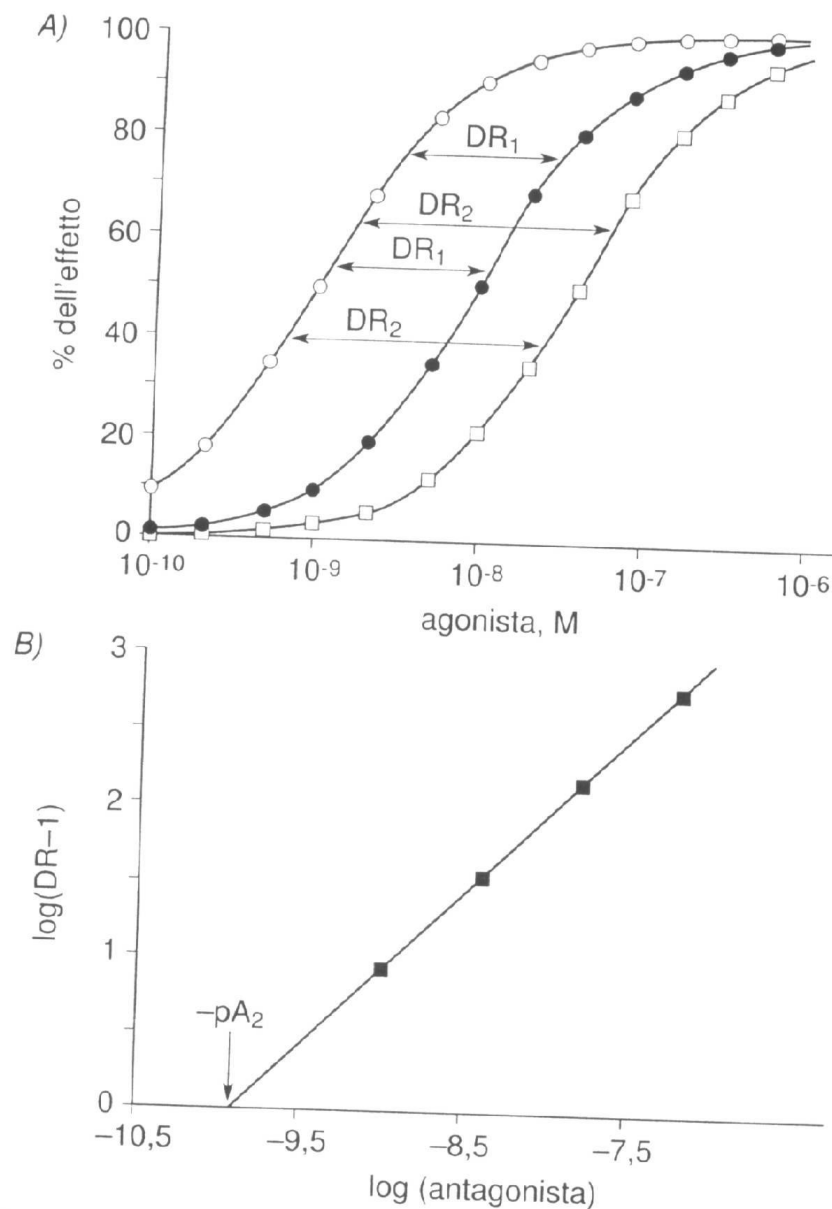
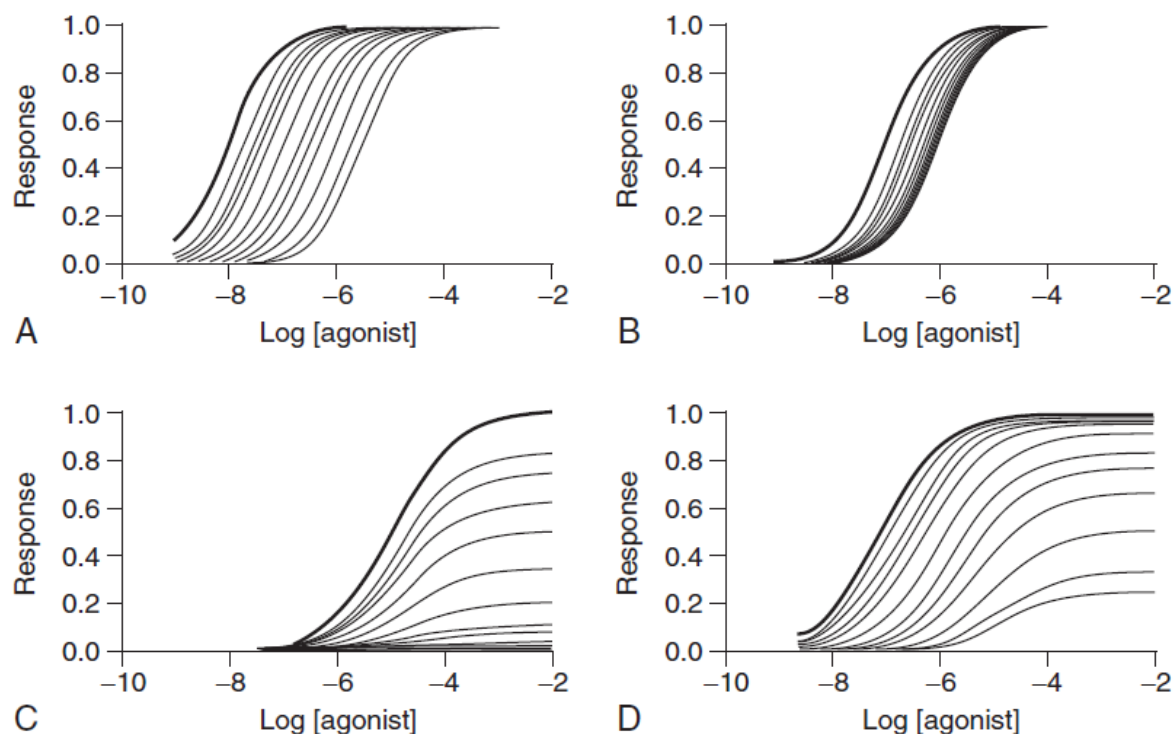


Fig. 3.12. A) Dose-ratio (DR, rapporto di dosi = distanza fra curve dose-risposta). B) Grafico di Schild per un agonista sor-montabile.

FIGURE 6.1 Effects of antagonists on agonist dose-response curves. (A) Surmountable antagonism with no diminution of maxima and no limiting antagonism (competitive antagonists). (B) Surmountable dextral displacement to a limiting value produced by an allosteric modulator. (C) Depression of dose-response curves with no dextral displacement produced by noncompetitive antagonists. (D) Dextral displacement with depression of maximum at higher concentrations produced by noncompetitive antagonists in systems with a receptor reserve for the agonist.



BOX 2: Criteri di identificazione di un recettore

Gli studi di *binding* permettono l'identificazione di siti di legame selettivi e saturabili per un determinato ligando. Tuttavia, selettività e saturabilità sono condizioni necessarie, ma non sufficienti, per poter concludere che il sito identificato è realmente un recettore; è infatti possibile che il ligando interagisca anche con altre molecole cellulari (accettori) saturabili e dotate di requisiti strutturali stringenti, come ad esempio enzimi, canali ionici, trasportatori ed altre. Per poter concludere che il sito di legame identificato è il recettore responsabile di una data attività biologica, se non è possibile clonarlo, è necessario valutare la specificità farmacologica del sito di legame, e confrontarla con quella del recettore funzionale. In altre parole, dagli studi di binding bisognerà ricavare le K_d di una serie di agonisti e/o antagonisti, mentre dall'analisi delle curve dose-risposta si ricaveranno i valori di pD_2 (agonisti) o pA_2 (antagonisti) per gli stessi composti. Si valuterà poi se esiste una correlazione fra queste due serie di valori, come mostrato in Fig. 1 di questo Box.

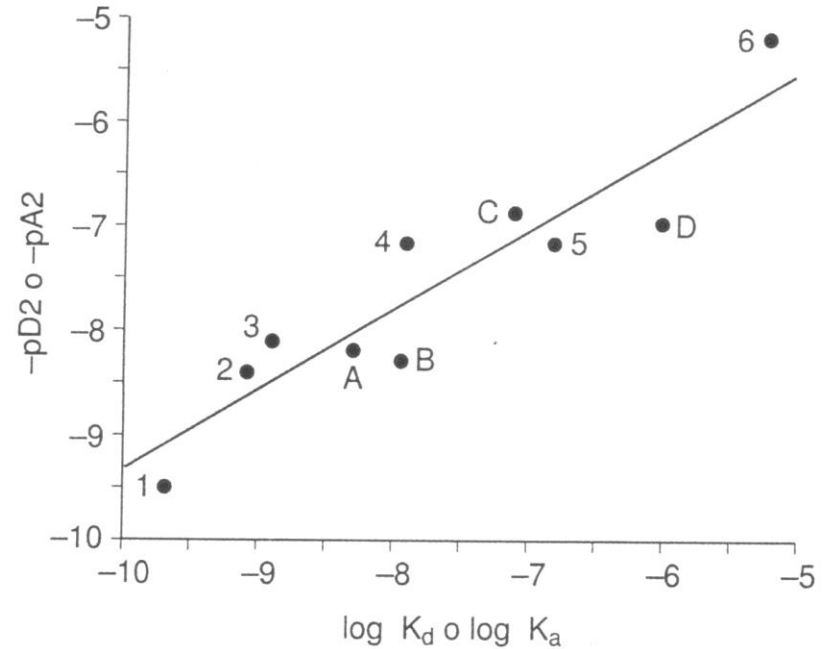


Fig. 1. Correlazione fra attività biologica e legame al recettore per una serie di agonisti ed antagonisti. In questo esempio viene correlata la broncocostrizione indotta da vari leucotrieni (punti A-D) o l'inibizione della stessa indotta da una serie di antagonisti (punti 1-6) con l'affinità ricavata da esperimenti di *binding* (saturazione o spiazzamento) al recettore di 3H -LTD₄. La correlazione è altamente significativa ($r^2 = 0,85$, $p < 0,001$).

...we knew the receptor bound histamine, so it was
a matter of keeping affinity and losing efficacy...

—Sir James Black (1996)

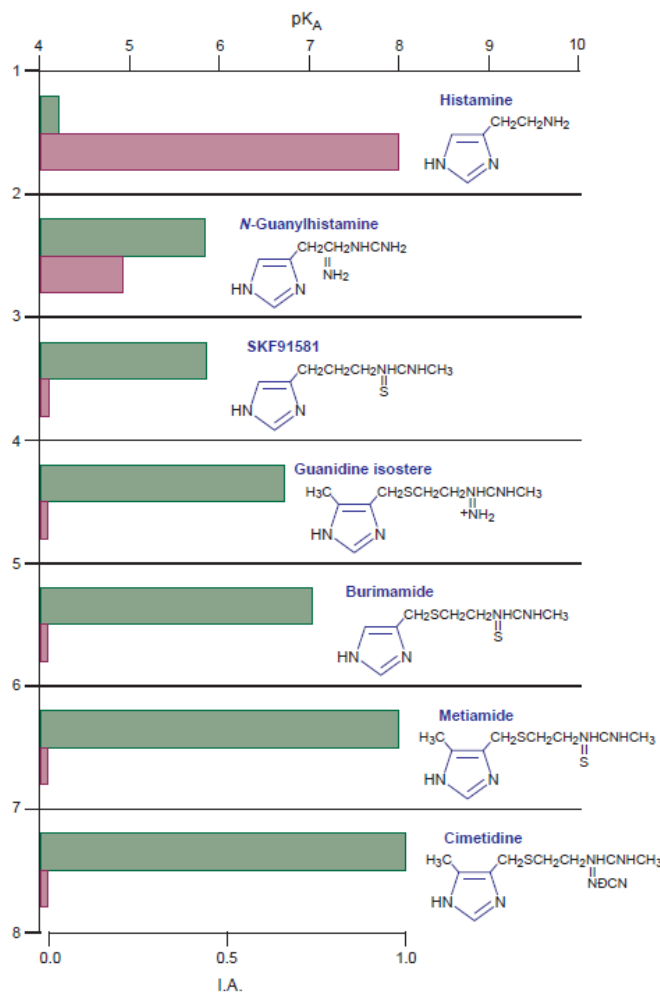
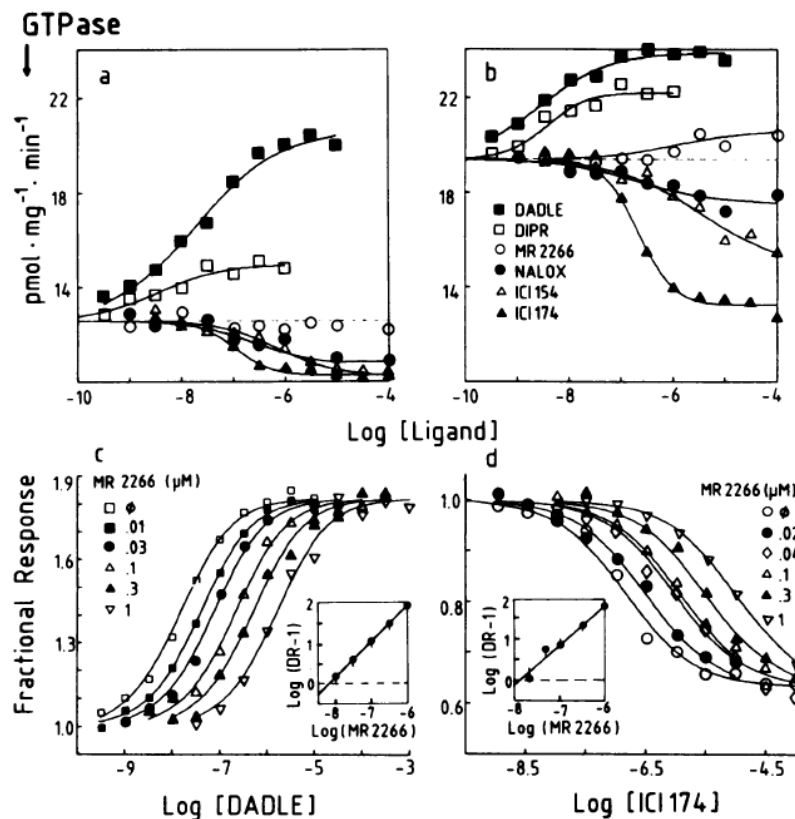


FIGURE 1.8 Key compounds synthesized to eliminate the efficacy (burgundy red) and enhance the affinity (green) of histamine for histamine H_2 receptors to make cimetidine, one of the first histamine H_2 antagonists of use in the treatment of peptic ulcers. Quotation from James Black [10].

Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins

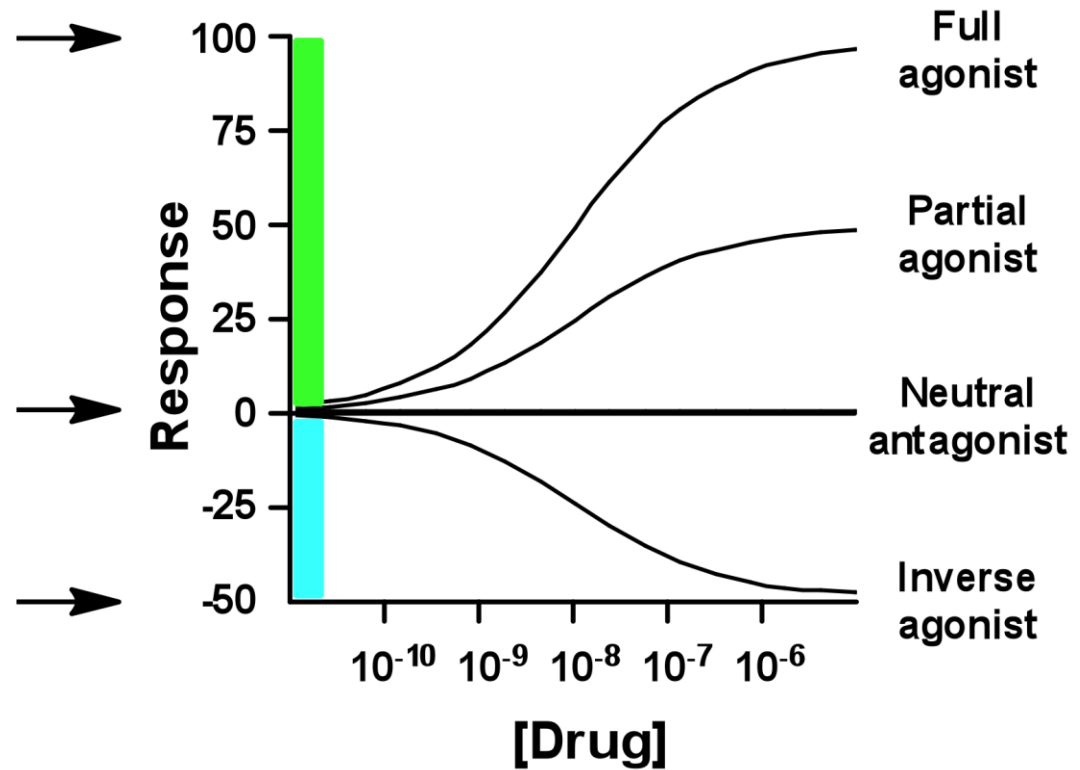
(guanine nucleotide-binding regulatory proteins/GTPase/ternary complex)

TOMMASO COSTA* AND ALBERT HERZ

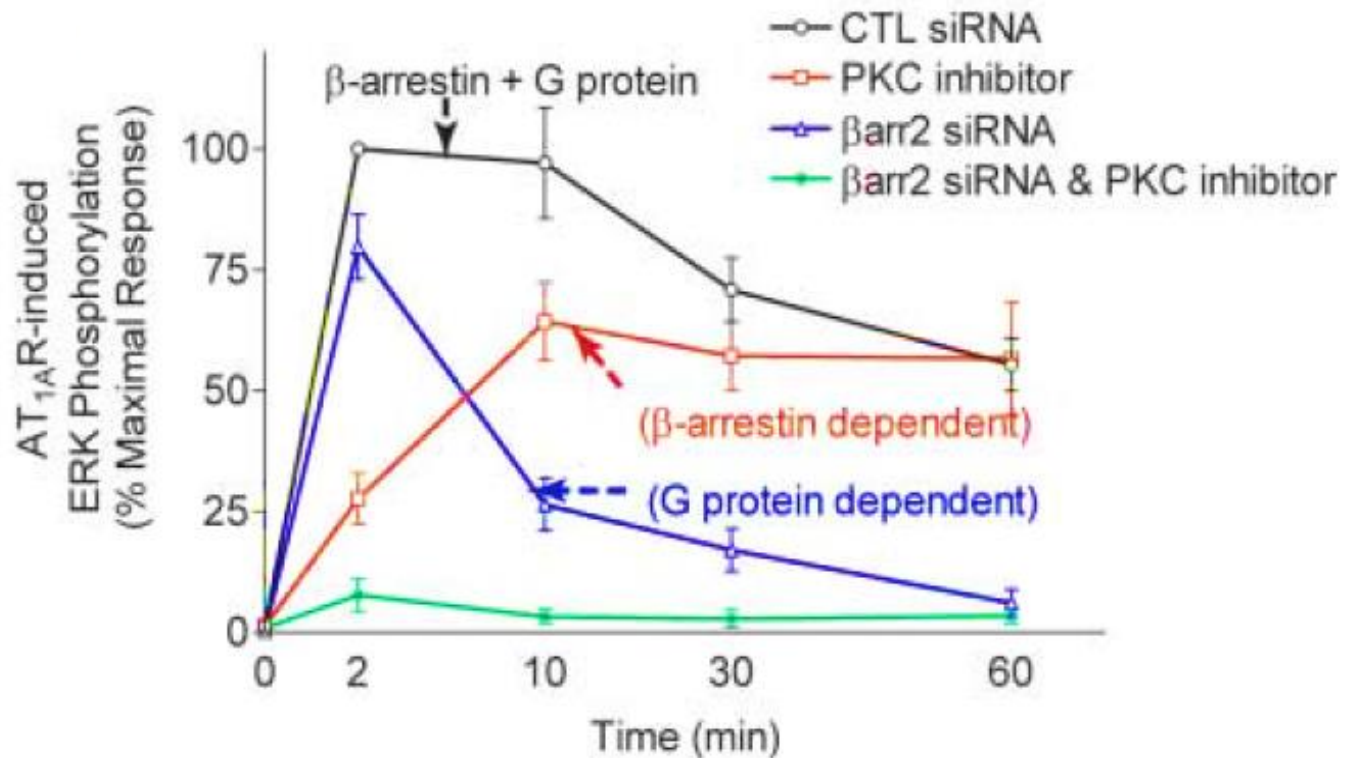


activation by
saturating
endogenous ligand

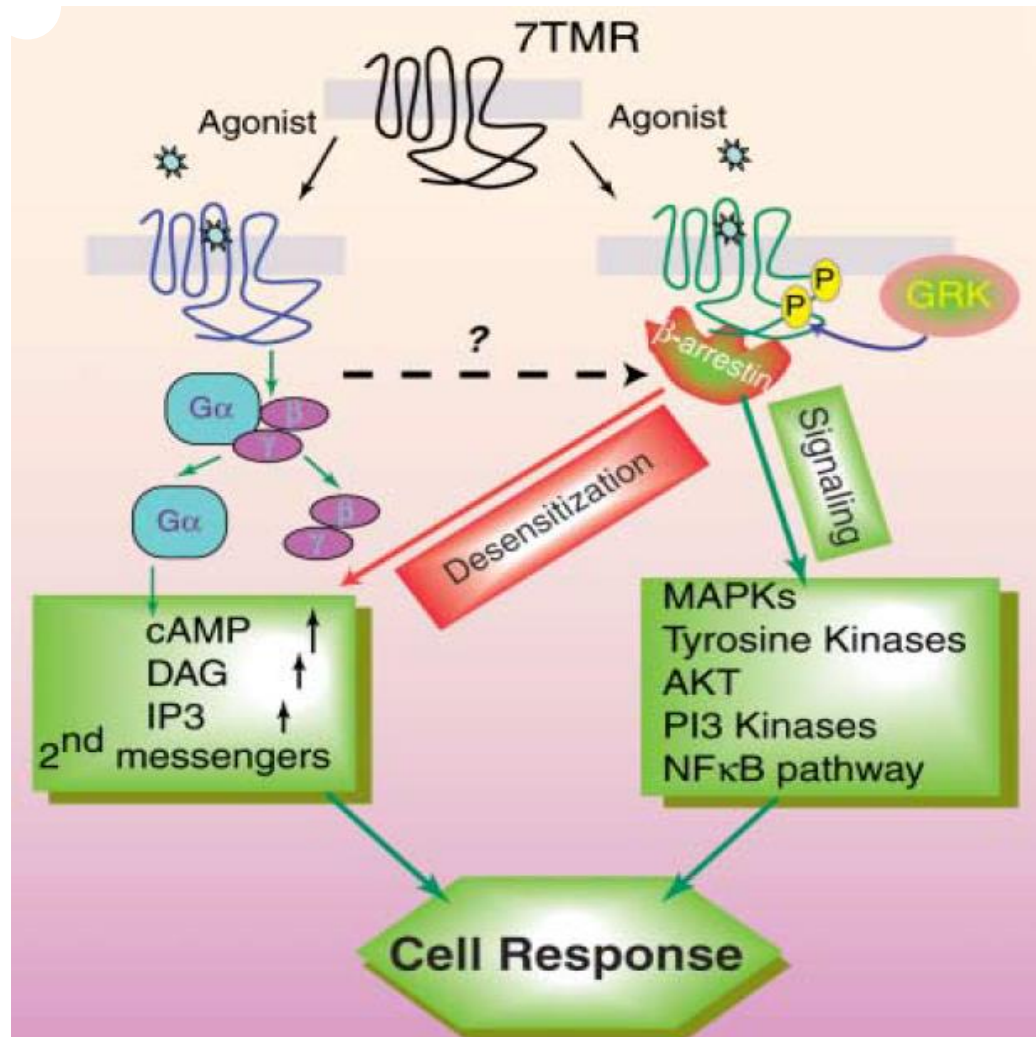
constitutive activity
of receptor in
absence of ligand



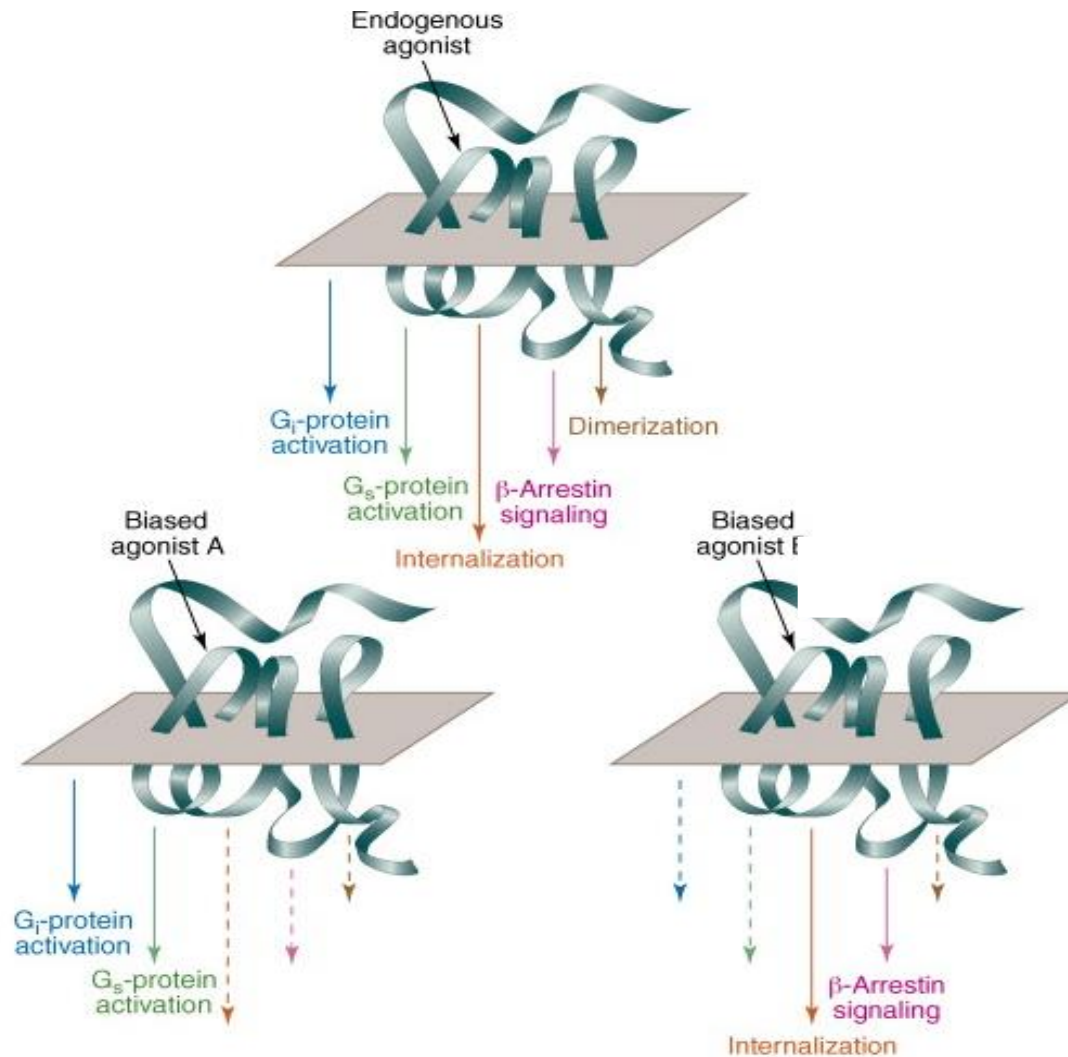
G-protein and arrestin act together in signaling



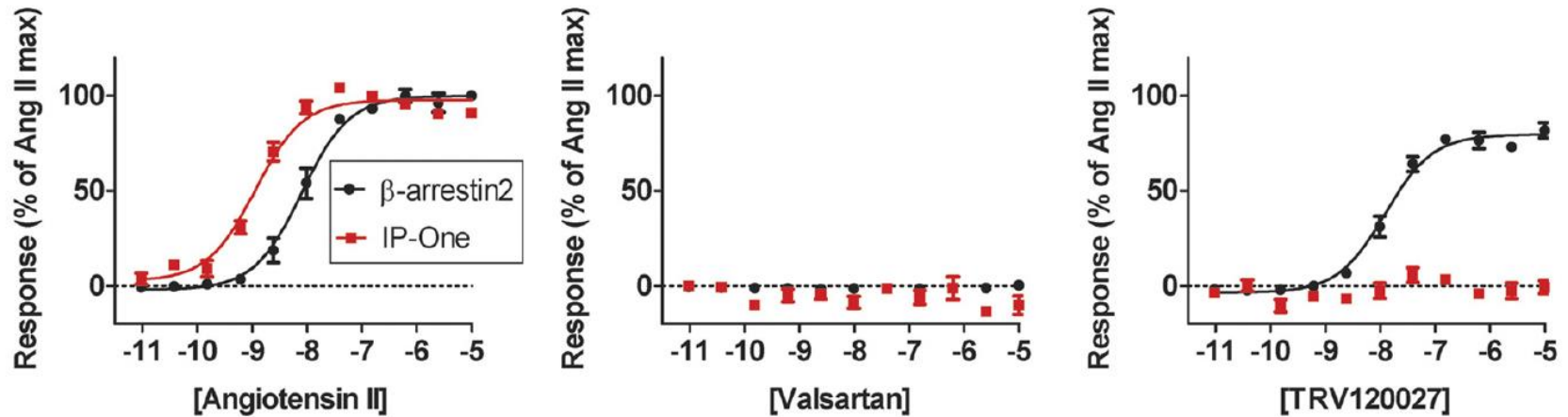
the GPCR/transduction model



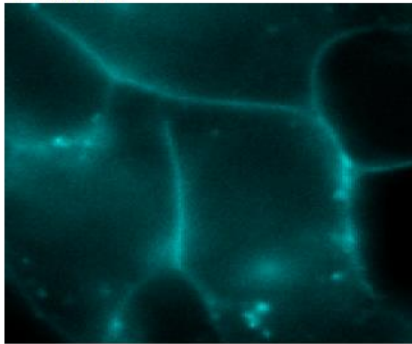
functional selectivity and biased agonism



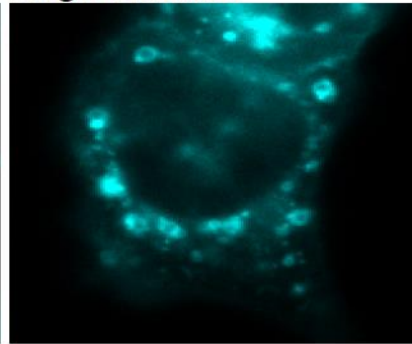
TRV027 and AT1R



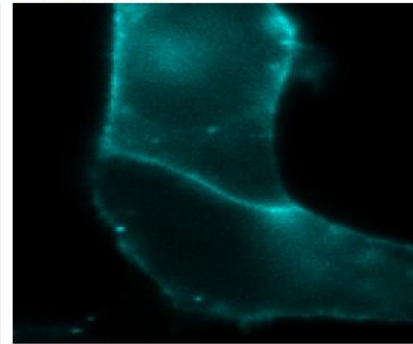
Vehicle



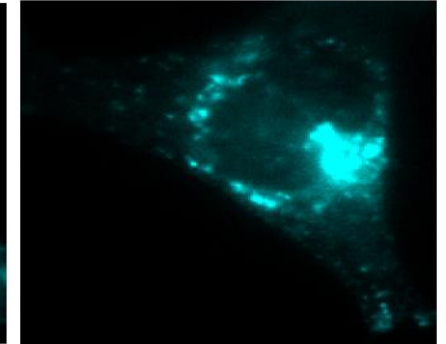
Angiotensin II



Valsartan

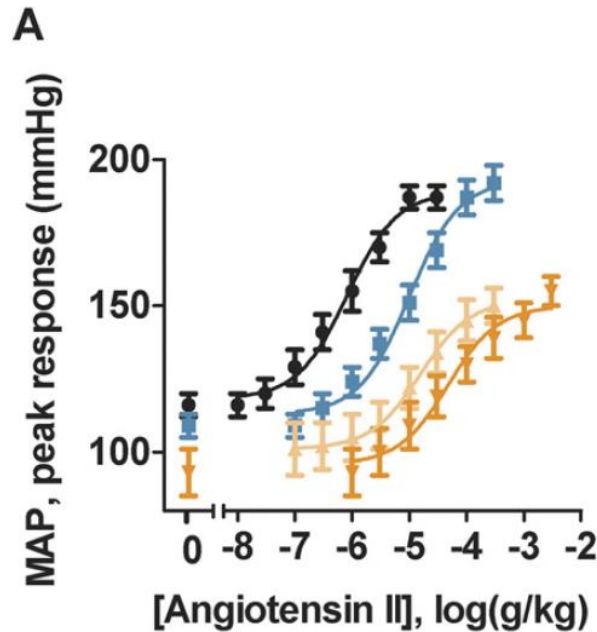


TRV120027

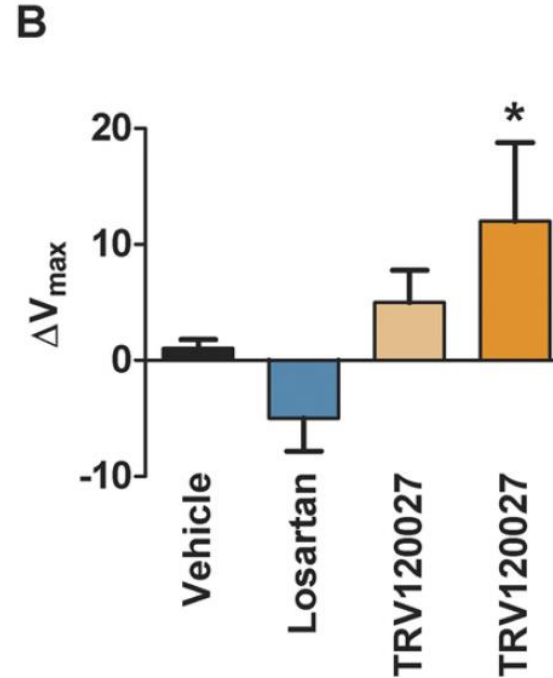


HEK-293 cells expressing fluorescently-tagged AT1_AR

AT1R agonists biased toward β -arrestin 1



- Vehicle
- Losartan, 3mg/kg
- ▲ TRV120027, 1 ug/kg/min
- ▼ TRV120027, 10 ug/kg/min



- Vehicle
- Losartan, 3mg/kg
- TRV120027, 1 ug/kg/min
- TRV120027, 10 ug/kg/min

TRV027 clinical evaluation

Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor

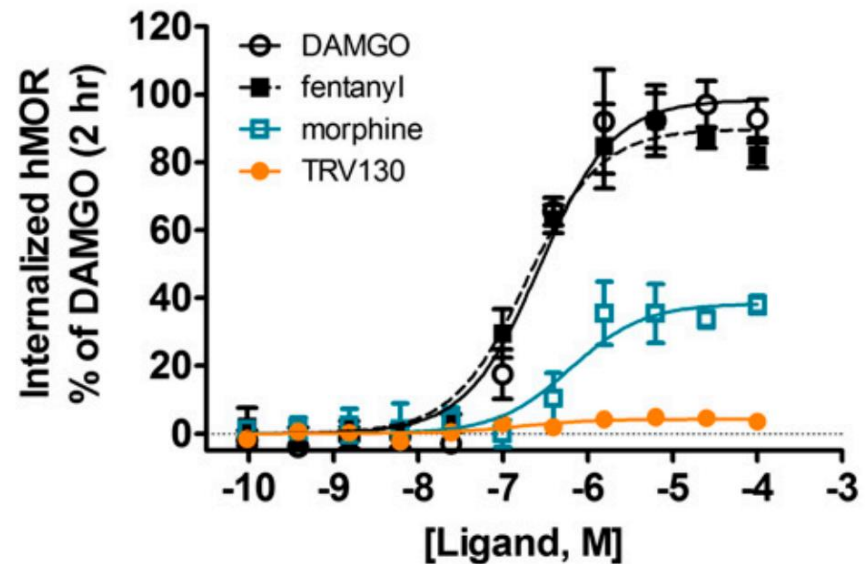
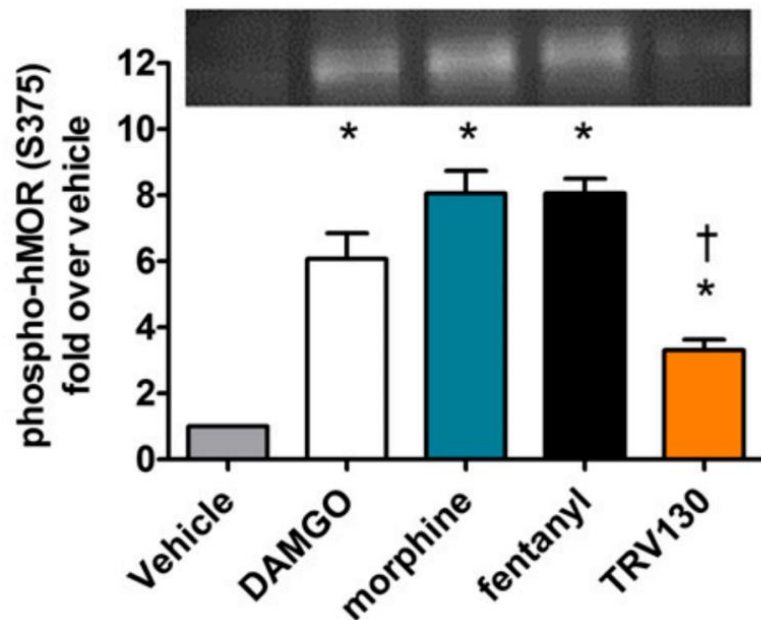
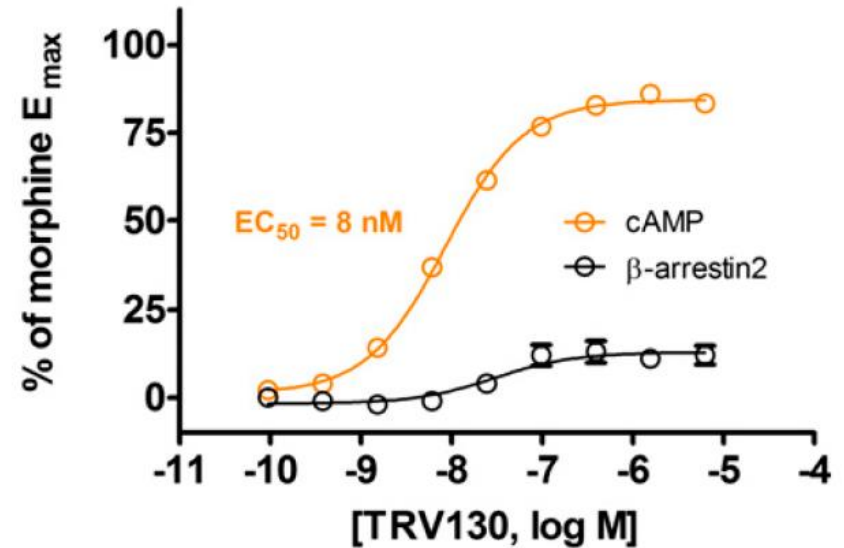
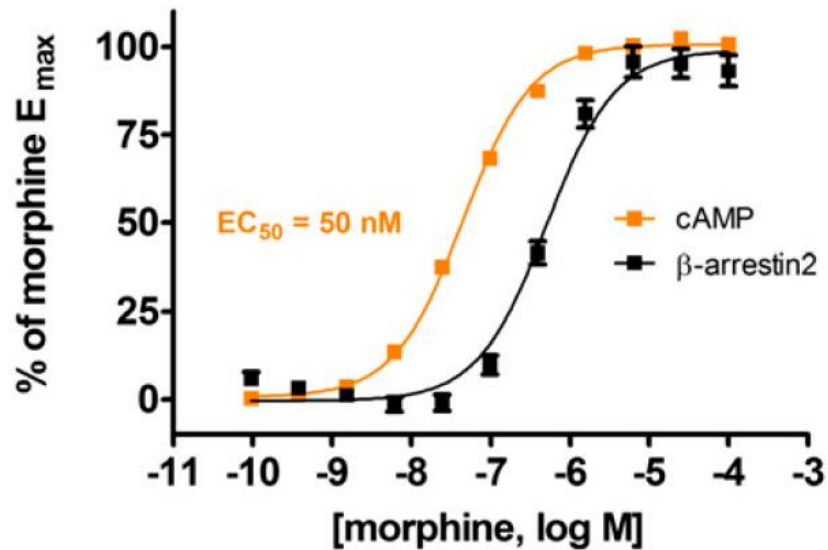
Rationale and Design of the BLAST-AHF Study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure)

G. Michael Felker, MD, MHS,* Javed Butler, MD, MPH,† Sean P. Collins, MD, MSc,‡ Gad Cotter, MD,§
Beth A. Davison, PhD,§ Justin A. Ezekowitz, MBBCh, MSc,|| Gerasimos Filippatos, MD,¶ Phillip D. Levy, MD,#
Marco Metra, MD,** Piotr Ponikowski, MD, PhD,†† David G. Soergel, MD,‡‡ John R. Teerlink, MD,§§
Jonathan D. Violin, PhD,‡‡ Adriaan A. Voors, MD, PhD,||| Peter S. Pang, MD¶¶

ABSTRACT

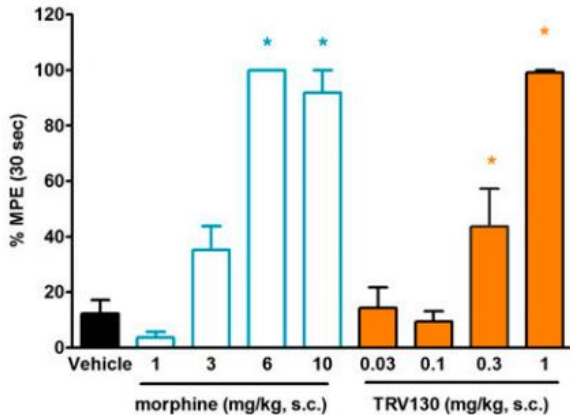
The BLAST-AHF (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure) study is designed to test the efficacy and safety of TRV027, a novel biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor, in patients with acute heart failure (AHF). AHF remains a major public health problem, and no currently-available therapies have been shown to favorably affect outcomes. TRV027 is a novel biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor that antagonizes angiotensin-stimulated G-protein activation while stimulating β -arrestin. In animal models, these effects reduce afterload while increasing cardiac performance and maintaining stroke volume. In initial human studies, TRV027 appears to be hemodynamically active primarily in patients with activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, a potentially attractive profile for an AHF therapeutic. BLAST-AHF is an international prospective, randomized, phase IIb, dose-ranging study that will randomize up to 500 AHF patients with systolic blood pressure ≥ 120 and ≤ 200 mm Hg within 24 h of initial presentation to 1 of 3 doses of intravenous TRV027 (1, 5, or 25 mg/h) or matching placebo (1:1:1:1) for at least 48 h and up to 96 h. The primary endpoint is a composite of 5 clinical endpoints (dyspnea, worsening heart failure, length of hospital stay, 30-day rehospitalization, and 30-day mortality) combined using an average z-score. Secondary endpoints will include the assessment of dyspnea and change in amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide. The BLAST-AHF study will assess the efficacy and safety of a novel biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor in AHF. (J Am Coll Cardiol HF 2015;■:■-■) © 2015 by the American College of Cardiology Foundation.

TRV130 and MOP receptor

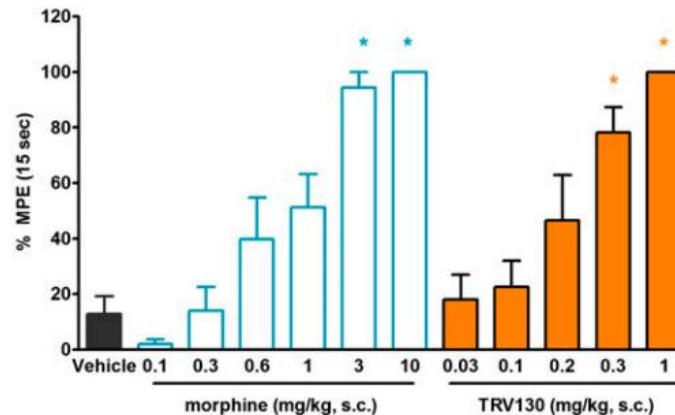


mu G-protein biased agonists

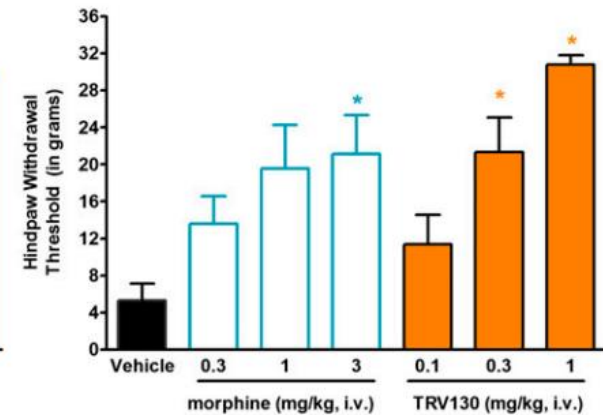
52°C hot plate



tail-flick latencies

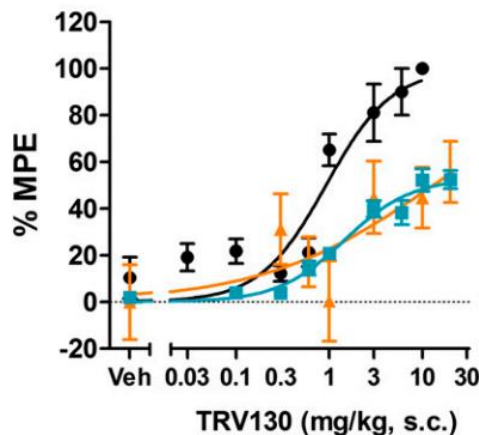
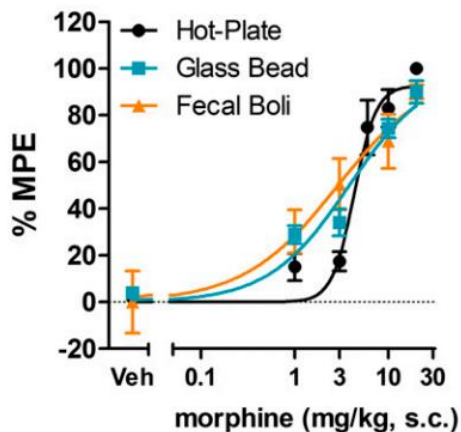


hindpaw incisional pain

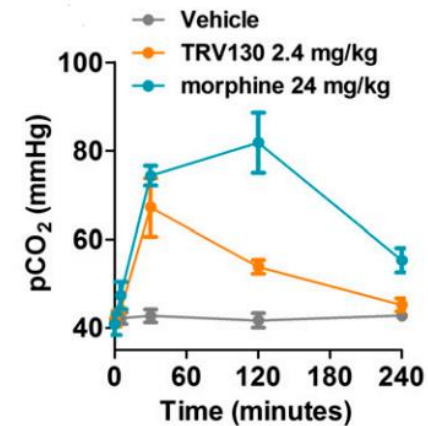
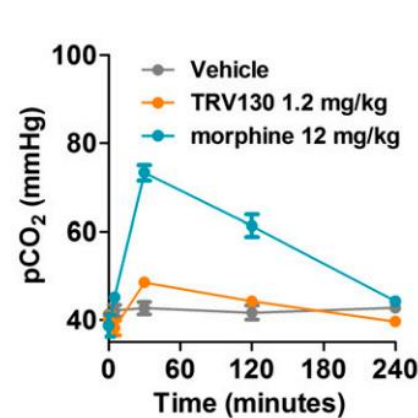


rats 30 minutes after injection

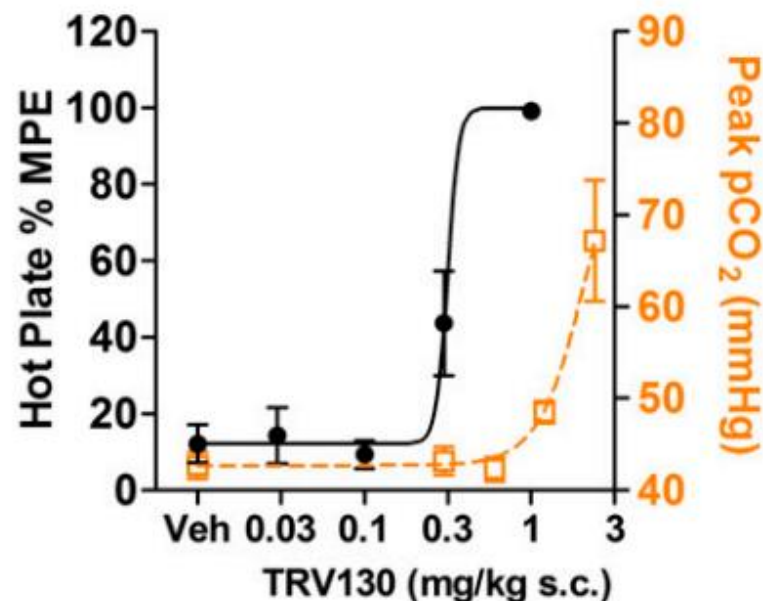
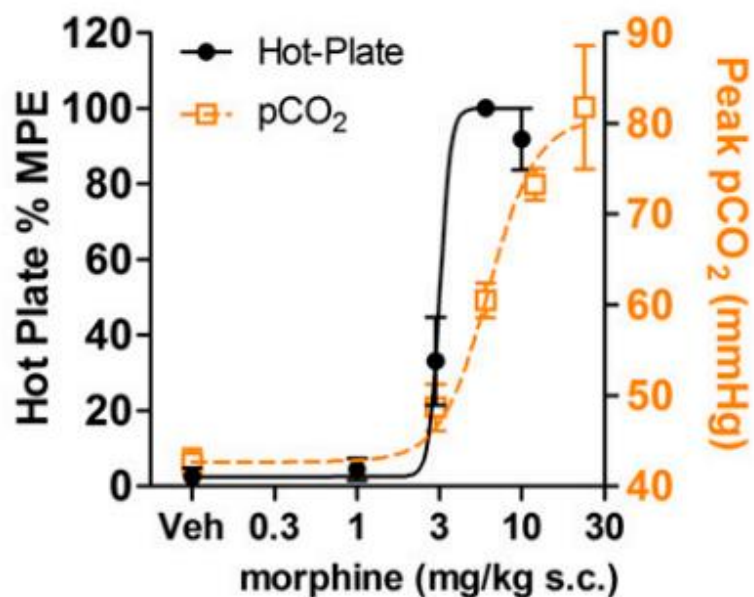
gastrointestinal side-effects



respiratory depression tests



TRV130 summary



compound	pEC ₅₀	cAMP	
		Efficacy	RAi G
TRV130	8.1	83	5.24
fentanyl	8.2	112	8.93
morphine	7.3	100	1.00

pEC ₅₀	Efficacy	β-arrestin2		Bias Ratio
		RAi β		
7.4	14	1.77		3.0
6.6	478	9.61		0.9
6.3	99	1.00		1.0

bias factor

Efficacy values are calculated as % maximal response to morphine

(n >10 independent experiments performed in duplicate)

human mu-opioid receptor (hMOR)

Intrinsic relative activity (RAi) and Bias Ratio values are calculated as indicated in the methods

Clinical evaluation of TRV130

Pain. 2014 Sep;155(9):1829-35. doi: 10.1016/j.pain.2014.06.011. Epub 2014 Jun 19.

Biased agonism of the μ -opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects versus morphine: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy volunteers.

Soergel DG¹, Subach RA², Burnham N³, Lark MW², James IE², Sadler BM⁴, Skobieranda F², Violin JD², Webster LR⁵.

Author information

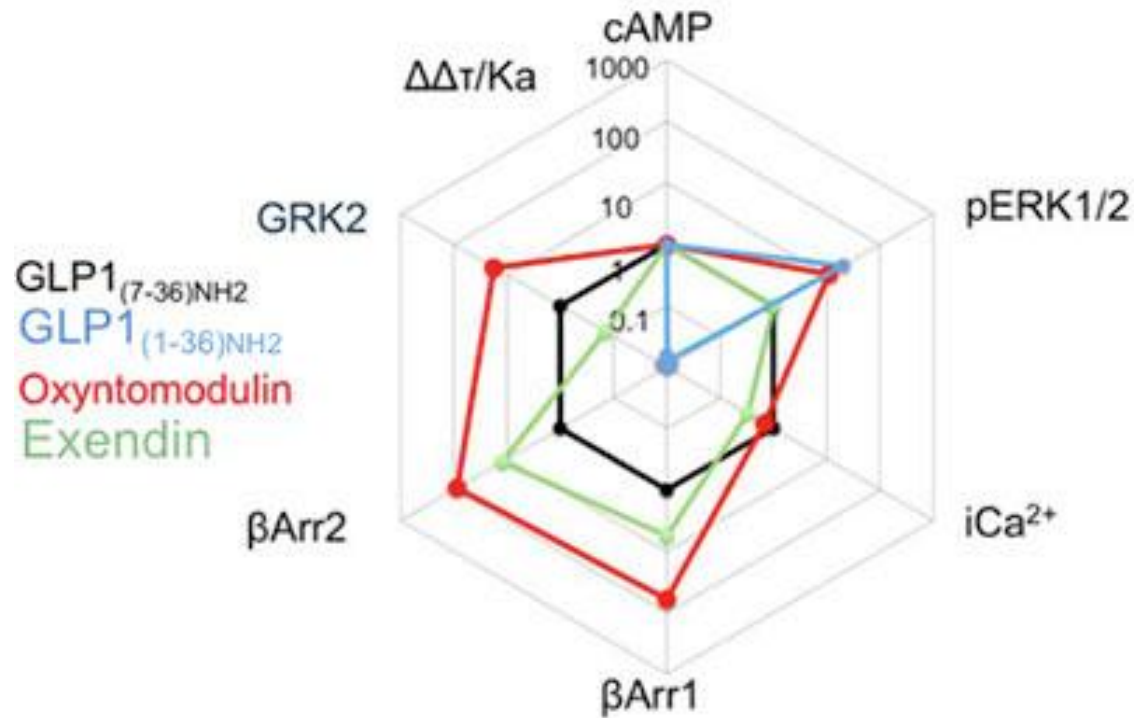
Abstract

Opioids provide powerful analgesia but also efficacy-limiting adverse effects, including severe nausea, vomiting, and respiratory depression, by activating μ -opioid receptors. Preclinical models suggest that differential activation of signaling pathways downstream of these receptors dissociates analgesia from adverse effects; however, this has not yet translated to a treatment with an improved therapeutic index. Thirty healthy men received single intravenous injections of the biased ligand TRV130 (1.5, 3, or 4.5mg), placebo, or morphine (10mg) in a randomized, double-blind, crossover study. Primary objectives were to measure safety and tolerability (adverse events, vital signs, electrocardiography, clinical laboratory values), and analgesia (cold pain test) versus placebo. Other measures included respiratory drive (minute volume after induced hypercapnia), subjective drug effects, and pharmacokinetics. Compared to morphine, TRV130 (3, 4.5mg) elicited higher peak analgesia (105, 116 seconds latency vs 75 seconds for morphine, $P < .02$), with faster onset and similar duration of action. More subjects doubled latency or achieved maximum latency (180 seconds) with TRV130 (3, 4.5mg). Respiratory drive reduction was greater after morphine than any TRV130 dose (-15.9 for morphine versus -7.3 , -7.6 , and -9.4 h⁺L/min, $P < .05$). More subjects experienced severe nausea after morphine ($n=7$) than TRV130 1.5 or 3mg ($n=0$, 1), but not 4.5mg ($n=9$). TRV130 was generally well tolerated, and exposure was dose proportional. Thus, in this study, TRV130 produced greater analgesia than morphine at doses with less reduction in respiratory drive and less severe nausea. This demonstrates early clinical translation of ligand bias as an important new concept in receptor-targeted pharmacotherapy.

Copyright © 2014 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

KEYWORDS: Biased ligand; Clinical trial; Morphine; Postoperative pain; mu-Opioid receptor

Web of efficacy



Where have all the active receptor states gone?

H Ogun Onaran & Tommaso Costa

