

DOCTORAL THESIS

**Adenosine receptor agonists and P2Y₁₂ receptor antagonists
exhibit combined inhibitory effect on blood platelet
function**

Nina Wolska, MSc

Supervised by Marcin Różalski, PhD

Department of Haemostasis and Haemostatic Disorders

Medical University of Łódź

Co-supervised by Izabela K. Piechocka, PhD

Laboratory of Modelling in Biology and Medicine

Institute of Fundamental Technological Research Polish Academy of Sciences

Department of Haemostasis and Haemostatic Disorders

Medical University of Łódź



Łódź, 2020

Abstract

Existing antiplatelet therapies are frequently associated with a risk of bleeding, while on the other hand, some patients respond insufficiently to the antiplatelet treatment. Large inter-individual variation in platelet response to endogenous agonists and pharmacological agents, including resistance to antiplatelet therapy, prompts a search for novel platelet inhibitors and development of new antithrombotic strategies. Recently, a dual experimental strategy for lowering platelet activity has been proposed that involves a low-dose inhibition of P2Y₁₂ receptor with a simultaneous activation of adenosine receptors (AR). This novel approach could result in the sufficient rate of platelet inhibition while minimizing the adverse effects.

Blood platelets express two (A_{2a} and A_{2b}) of the four known AR subtypes. Activation of these receptors results in an enhanced intracellular cAMP level and leads to the inhibition of platelet aggregation. This work aims to provide the proof of concept for a supporting role of AR agonists in P2Y₁₂-based antiplatelet therapy.

I tested the antiplatelet potential of AR agonists in combination with the standard strategy of antagonizing P2Y₁₂ receptor with inhibitors currently in clinical use (cangrelor and prasugrel metabolite R-138727, prasugrel being a pro-drug). Various hallmarks of platelet activation were monitored to assess the effects of AR agonists on platelet function with the use of platelet aggregation assays, flow cytometry, cAMP measurements, and under flow clot formation studies with the use of whole blood or isolated platelets obtained from healthy volunteers.

I evaluated *in vitro* the effects of three AR agonists: regadenoson, LUF5835 and NECA, of varying selectivity for platelet adenosine receptors. The major finding was the conclusion that AR agonists while much less effective under static conditions than P2Y₁₂ antagonists, demonstrated similar antiplatelet activity under flow mimicking the physiological environment. AR agonists significantly improved the antiplatelet effect of P2Y₁₂ antagonists, regardless of their selectivity profiles and antiplatelet activities. Moreover, inhibitory effects in combination with P2Y₁₂ antagonists were similar in high- and low-responders to P2Y₁₂ inhibitors, indicating that a combination of such antiplatelet agents represents a promise of overcoming the drug resistance problem and offers hope of a more predictable and stable antiplatelet intervention in the population.

A broad panel of AR agonists (PSB0777, CGS21680, MRE0094, 2-chloroadenosine, CV1808, HE-NECA, NECA, regadenoson, and UK423,097) in combinations with P2Y₁₂ receptor inhibitors has been investigated providing a methodologically consistent report of their respective effects on multiple stages of platelet function (platelet viability, P-selectin expression, GPIIb-IIIa activation, fibrinogen binding, calcium ion mobilization, VASP-P level, and cAMP formation). I found that the antiplatelet effect potentiation in the combined system is a robust phenomenon across all the tested methods. It was also established that the methods assessing early activation events are better suited to assess the antiplatelet action in a case of the proposed treatment, as the most sensitive markers among the tested ones were calcium mobilization and cAMP level measurements.

In conclusion, a strategy focused on a purinergic pathway and involving a suboptimal inhibition of classical purinergic ADP receptors (P2Y) with a simultaneous activation of adenosine receptors presents a novel, promising approach to prevent thrombotic events of improved safety and efficacy.

Streszczenie

Obecnie stosowane leczenie przeciwplatek często wiąże się z ryzykiem krwawienia, z drugiej strony znaczna grupa pacjentów odpowiada na terapię w niewystarczającym stopniu. Duża zmienność osobnicza w odpowiedzi płytek krwi na agonistów i stosowane leki przeciwplatekowe, w tym oporność na terapię przeciwplatekową obserwowana w niektórych grupach pacjentów skłaniają do poszukiwań nowych inhibitorów aktywacji płytek krwi i/lub nowych strategii terapeutycznych. Niedawno postawiona przez naszą grupę badawczą hipoteza sugeruje, że skojarzona terapia eksperymentalna za pomocą agonistów receptorów adenozynowych (AR) i antagonistów receptora P2Y₁₂ może skutkować wystarczającym hamowaniem funkcji płytek krwi przy jednoczesnym zminimalizowaniu skutków ubocznych.

Płytki krwi wykazują ekspresję dwóch (A_{2a} i A_{2b}) z czterech znanych podtypów AR. Aktywacja tych receptorów skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP i prowadzi do zahamowania aktywacji i agregacji płytek krwi. Celem poniższej pracy jest udowodnienie słuszności koncepcji wspierającej roli agonistów AR w eksperymentalnej terapii przeciwplatekowej opartej na jednoczesnej aktywacji AR i inhibicji receptora P2Y₁₂.

Potencjał przeciwplatekowy agonistów AR w połączeniu z klasyczną strategią blokowania receptora P2Y₁₂ współcześnie stosowanymi inhibitorami (kangrelor i metabolit R-138727 prasugrelu (prasugrel jest prolekiem)) został zbadany korzystając z szeregu klasycznych metod biochemicznych i metod specyficznych dla oznaczania funkcji płytek krwi. Oznaczono wpływ agonistów AR na funkcję płytek krwi z wykorzystaniem testów agregometrycznych, cytometrii przepływowej, testu ELISA oraz badań tworzenia skrzepów w warunkach przepływu, z użyciem pełnej krwi lub izolowanych płytek krwi pobranych od zdrowych ochotników.

Oceńłam działanie przeciwplatekowe trzech agonistów AR: regadenozonu, LUF5835 i NECA, o różnej selektywności w stosunku do płytkowych receptorów adenozynowych. Wykazałam, że agoniści AR pomimo, że działają znacznie mniej skutecznie w warunkach statycznych niż antagoniści P2Y₁₂, wykazują podobną aktywność przeciwplatekową w środowisku przepływu naśladującym warunki fizjologiczne. Agoniści AR znacząco nasilali działanie przeciwplatekowe antagonistów P2Y₁₂, niezależnie od ich profilu selektywności i aktywności przeciwplatekowej. Co więcej, działanie hamujące w połączeniu z antagonistami P2Y₁₂ osiągnęło porównywalny poziom u pacjentów u których obserwowano silną i słabszą

odpowieź na inhibitory P2Y₁₂ co wskazuje, że takie połączenie leków przeciwplatek może przyczynić się do przezwyciężenia problemu lekooporności i daje nadzieję na bardziej przewidywalną i stabilną interwencję przeciwplatekową.

Przebadalam szeroki panel agonistów AR (PSB0777, CGS21680, MRE0094, 2-chloroadenozyna, CV1808, HE-NECA, NECA, regadenoson i UK423,097) w połączeniu z inhibitorami receptora P2Y₁₂, koncentrując się na ich wpływie na różne parametry funkcji płytek krwi (żywołność płytek, ekspresja P-selektyny, aktywacja GPIIb-IIIa, wiązanie fibrynogenu, mobilizacja jonów wapnia, poziom VASP-P i tworzenie cAMP). Dowiodlam, że wzrost efektu przeciwplatekowego w modelu skojarzonym jest zjawiskiem zachodzącym na wszystkich testowanych poziomach aktywacji płytki. Ustaliłam również, że metody badania wczesnych epizodów aktywacji płytek są bardziej odpowiednie do oceny działania przeciwplatekowego w przypadku proponowanej interwencji, gdyż najbardziej czułymi markerami spośród badanych były pomiary mobilizacji wapnia i stężenia cAMP.

Podsumowując, strategia przeciwplatekowa skoncentrowana na szlaku purynergicznym i polegająca na suboptymalnym hamowaniu receptora ADP (P2Y₁₂) z jednoczesną aktywacją receptorów adenozynowych stanowi nowe, obiecujące podejście do zapobiegania zdarzeniom zakrzepowym, o zwiększonym bezpieczeństwie i skuteczności.