

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/71808>

Author: Janssen, A.P.A.

Title: Inhibitor selectivity: profiling and prediction

Issue Date: 2019-05-01

Ik geloof dat wetenschappelijke kennis fractale eigenschappen heeft, dat het niet uitmaakt hoeveel we leren, hetgeen overblijft, hoe klein het ook mag lijken, is nog steeds zo oneindig complex als het geheel was aan het begin.

Isaac Asimov (eigen vertaling)

Samenvatting

Algemene samenvatting

Het gepresenteerde onderzoek in dit proefschrift betreft één van de grootste uitdagingen in de moderne medicijnontwikkeling: selectiviteit. Het medicijnonderzoek dat gericht is op een moleculair doel, is gebaseerd op de notie dat een specifiek eiwit een sleutelrol speelt in een bepaald biologisch proces. Hoewel deze aanpak van medicijnontwikkeling kan worden bekritiseerd¹, staat het belang van selectieve aanpassing van doel-eiwitten met behulp van chemische modulators buiten kijf. Het belang van selectiviteit wordt nog versterkt wanneer de modulators worden gebruikt om het therapeutische potentieel van het doel-eiwit te bewijzen. In de regel dient in de praktijk een therapeutische marge te

worden bepaald, waarbinnen het doeleiwit selectief gemoduleerd wordt. Bij hogere concentraties kunnen de effecten van het binden van andere eiwitten tot bijwerkingen en zelfs tot toxiciteit leiden.

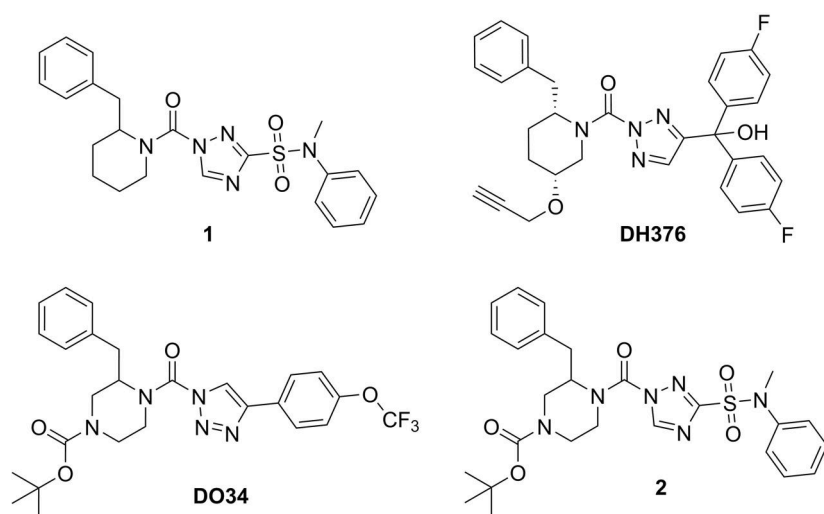
Vanwege het belang van selectiviteit zijn er veel technieken ontwikkeld om de selectiviteit van remmers te bepalen, zoals familie-brede activiteitstesten (bijvoorbeeld voor kinases en luciferases) en specifiekere tests zoals het 44 eiwitten tellende CEREP-panel.² Een andere veelgebruikte techniek is activiteit-gebaseerde eiwit profilering (in het Engels: *activity-based protein profiling* of ABPP). Deze techniek heeft haar flexibiliteit bewezen en heeft daardoor tot een grote variëteit aan toepassingen geleid binnen de medicijnontwikkeling. Het principe achter ABPP is geïntroduceerd in **Hoofdstuk 1**. Een specifiek veld waarbinnen ABPP haar waarde heeft bewezen is het onderzoek naar het endocannabinoïde systeem (ECS).³⁻⁶ Het ECS staat in de belangstelling vanwege zijn rol in pijnperceptie en inflammatie. Het signaleringssysteem bestaat in hoofdzaak uit de twee cannabinoïde receptoren (CB1 en CB2) en de belangrijkste endogene liganden, 2-arachidonoylglycerol (2-AG) en *N*-arachidonoyl ethanolamine (anandamide). Daarnaast spelen de synthetische en katabolische enzymen een belangrijke rol. 2-AG is de meest voorkomende endocannabinoïde en wordt voornamelijk geproduceerd door diacylglycerol lipase (DAGL) α en β . De verschillende rollen van de twee ECS signaallipides en de precieze functies van de twee isovormen van DAG-lipase zijn nog verre van duidelijk. Om onderzoek naar de functies van DAG-lipase mogelijk te maken is het nodig om *in vivo* actieve remmers te vinden, en om die specifiek en in meer detail te kunnen bestuderen.

Diacylglycerol lipase remmers: activiteit en specificiteit

Hoofdstuk 2 introduceerde de *hit-to-lead* optimalisatie van een nieuw chemotype als DAGL-remmer, de 1,2,4-triazool-sulfonamides. Dit type moleculen werd gevonden in een eerder beschreven screening van ruim 300.000 stoffen.⁷ In dit hoofdstuk zijn de structuur-activiteitsrelaties bestudeerd door het testen van 65 varianten. Tijdens deze optimalisatie werd de inhibitie van DAGL- α met een factor 500 verbeterd, van een half-maximale inhibitie concentratie (IC_{50}) van ongeveer 1 μ M tot slechts 2.5 nM. Door met ABPP de hele set ook in eiwitpreparaten van muizenhersenen te testen, kon de meest selectieve remmer worden geïdentificeerd om deze vervolgens te profileren. Stof **1** (Figuur 1), een 2-gesubstitueerde benzylpiperidine triazool ureum, bleek actief te zijn in culturen van Neuro-2a cellen. Om ook de *in vivo* werking van deze stof te bepalen, werd zij, samen met een gealkynyleerd analogon, intra peritoneaal geïnjecteerd in muizen. Na een incubatie van twee uur werden de hersenen en de milt geprepareerd en geanalyseerd met gel-gebaseerde ABPP. Hierdoor kon de resterende activiteit van de serine hydrolases worden gevisualiseerd. Beide stoffen bleken de bloed-brein barrière te kunnen passeren en remden DAGL- α sterk in het hersenweefsel.

Hoofdstuk 3 draaide om de optimalisatie van de fysicochemische eigenschappen van stof **1**. De focus lag op het verhogen van het topologische polaire oppervlak om hierdoor de verspreiding van de remmers tot de perifere organen te beperken, om hierdoor voornamelijk de perifeer gelokaliseerde DAGL- β te remmen. De optimalisatie werd begonnen door de piperazine uit de eerder gepubliceerde stof DO34 op te nemen in de structuur, wat leidde tot de zeer potente remmer **2** (Figuur 1). Vervolgens werd een

coherente set van 24 varianten gesynthetiseerd waarin de *tert*-butyl carbamaat substitutie vervangen werd door een selectie van amides, ureum-verbindingen, tertiaire amines en sulfonamides. Dit leidde tot vier zeer potente en *in vitro* selectieve remmers welke in Neuro-2a culturen werden getest. Een ruime tienvoud afname in de inhibitieconstante toonde aan dat de cellulaire opname minder efficiënt verliep. Dit kan mogelijk worden verklaard door een verminderde passieve diffusie over het celmembraan als gevolg van de sterk verhoogde polariteit van de verbindingen. Opvallend genoeg bleek de selectiviteit die gevonden was *in vitro* zich niet goed te vertalen naar de cellulaire omstandigheden.



Figuur 1 | Chemische structuren van remmer **1**, referentiestof DH376 en DO34 en remmer **2**.

Hoofdstuk 4 beschreef de nauwgezette bestudering van de structuur-kinetiek relaties van een kleine set DH376 derivaten. Een eerder gepubliceerde biochemische surrogaat substraat analyse werd aangepast om de affiniteit (K_i) en reactiviteit (k_{inact}) van deze mechanisme-gebaseerde covalente remmers afzonderlijk te kunnen bepalen.³ DynaFit programmatuur⁸ werd gebruikt om een systeem van differentiaal vergelijkingen numeriek op te lossen, op basis van de door de kinetische analyse gegenereerde substraat omzettingcurves. Onverwachts volgden de inactivatie constantes (k_{inact}) totaal niet de trend in zuurtegraad (pK_a) van de heterocyclische verbindingen, wat op basis van de standaardtheorieën aangaande nucleofugiciteit werd voorspeld. Het bleek juist dat de positie en het aantal stikstofatomen in de heterocycle sterk de bindingsconstante K_i beïnvloedden. De 1,2,3-triazool van DH376 bleek te binden met een picomolaire affiniteit.

Activiteit-gebaseerde eiwit profilering om de selectiviteit van remmers te bestuderen

Hoofdstuk 5 demonstreerde de kracht van activiteit-gebaseerde eiwit profilering in een zeer relevante studie naar de interactieprofielen van het dodelijke kandidaat medicijn BIA 10-2474. Deze stof was ontworpen als fatty acid amide hydrolase (FAAH) remmer. Tijdens een fase 1 klinische studie in Frankrijk, begin 2016, moesten 5 deelnemers aan de

hoogste doseringsgroep worden opgenomen in het ziekenhuis met ernstige neurologische klachten. Een van de vrijwilligers overleed enkele dagen later. De belangrijkste hypothese om deze ernstige bijwerkingen te verklaren richtte zich op de mogelijkheid van zogenaamde bijvangst, onbedoeld gebonden eiwitten. Om deze hypothese te kunnen testen werd BIA 10-2474 gesynthetiseerd, samen met drie alkyn-gesubstitueerde analoga. De inhibitie van BIA 10-2474 werd getest in een breed palet van ECS gerelateerde enzymen, alsmede beide CB-receptoren, en bleek *in vitro* enkel FAAH-activiteit (zwak) te remmen. Het interactieprofiel van BIA 10-2474 tegen 50 serine hydrolases werd getest met ABPP in lysaat van muizenhersenen. ABHD6 werd gevonden als bijvangst met een inhibitieconstante in dezelfde orde grootte als nodig voor de volledige inhibitie van FAAH. Het covalente karakter van de inhibitie door de imidazool-ureum werd gedemonstreerd door de alkyn-analoga te ligeren aan fluoroforen met behulp van zogenaamde 'click'-chemie. Onder denaturerende SDS-PAGE-condities bleken FAAH en ABHD6 nog steeds meetbaar fluorescent gelabeld te worden. *In situ* profilering van de remmers toonde een dramatische toename in inhibitiecapaciteit voor zowel FAAH als ABHD6. Deze toename werd niet gevonden voor een veilige FAAH-remmer, PF-04457845.⁹ Door *in situ* behandelde neurale celculturen te analyseren met hoge resolutie massaspectrometrische analyse technieken, werden additionele beiwitten geïdentificeerd. Deze werden gevalideerd door ze tot overexpressie te brengen en de *in situ* inhibitie vervolgens met ABPP te visualiseren. Een belangrijk punt is dat deze eiwitten niet werden geremd door PF-04457845, een FAAH-remmer die zich veilig heeft bewezen in fase 1 en 2 klinische studies. Alle eiwitten hadden met het lipidemetabolisme te maken, daarom werden de lipideniveaus geanalyseerd met gerichte lipodomics. Dit legde een ingrijpende verstoring van de lipidenetwerken in deze gecultuurde neuronen bloot. Dit suggereert dat niet-selectieve lipaseremmers metabolische deregulatie in het zenuwstelsel kunnen veroorzaken. Het belang van grondige interactieprofilering, mogelijk gemaakt door ABPP, werd nogmaals benadrukt en het gebruik ervan aangemoedigd.

Hoofdstuk 6 beschreef de ontwikkeling en diepgaande karakterisering van een groen-fluorescente fluorofosfonaat sensor, BODIPY-FP, een analogon van de veelgebruikte rood-fluorescente TAMRA-fluorofosfonaat. Deze nieuwe moleculaire sensor kan onafhankelijk van de DAG-lipase gerichtte, eveneens rood-fluorescente, sensor MB064 worden uitgelezen. De labelingsefficiëntie van verscheidene eiwitten door de nieuwe BODIPY-FP bleek significant af te wijken van TAMRA-FP. Met name de affiniteit voor FAAH en monoacylglycerol lipase (MAGL) bleek sterk verhoogd. Hierdoor kon BODIPY-FP op zeer lage concentratie (10 nM) gemengd worden met MB064 en detecteerbaar FAAH en MAGL labelen, zonder te interfereren met het labelingspatroon van MB064. Deze cocktail maakte het mogelijk om bijna alle endocannabinoïde gerelateerde serine hydrolases in een enkel monster te profileren. Deze multiplex ABPP-methode werd gebruikt om de selectiviteit van twee MAGL-remmers te testen, NF1819 en ABX-1431.^{10,11} NF1819 bleek nog enkele andere eiwitten te remmen, waaronder ABHD6. ABX-1431 liet geen andere inhibitie activiteit zien bij 10 µM in de geteste muizenhersenenpreparaten.

Automatisch leren om inhibitieprofielen te voorspellen

Hoofdstuk 7 introduceerde de toepassing van het automatisch lerende algoritme *t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding* (t-SNE) als maat voor de vergelijkbaarheid van (bio)moleculen. In tegenstelling tot de veelgebruikte Tanimoto coëfficiënt (T_c), een afstandsmaat die met (moleculaire) bitstrings overweg kan, genereert t-SNE een tweedimensionale visualisatie van de hoogdimensionale bitstring ruimte. Dit maakt het mogelijk om de omringende chemische materie visueel te inspecteren, iets wat niet kan wanneer men de T_c gebruikt. De t-SNE vergelijkbaarheidsvisualisatie werd toegepast op 2774 klinisch toegepaste moleculen als demonstratie van de medicijnachtige chemische ruimte. Deze visualisatie toonde sterke colokalisering van chemisch gerelateerde stoffen. t-SNE werd ook toegepast op een fysicochemische bitstring gebaseerd op de uitgelijnde aminozuurvolgordes van eiwitten uit de serine hydrolase familie. Hiermee werd aangetoond dat t-SNE in staat is om hieruit fylogenetische informatie te herleiden. De in kaart gebrachte eiwitruimte werd geannoteerd met de inhibitiewaardes van een diverse set stoffen, eerder gemeten in een ABPP-gebaseerde analyse.¹² Ondanks het beperkte formaat van de beschikbare dataset kon enige groepering in de sterk geremde eiwitten worden opgemerkt. Dit duidt erop dat deze aanpak in theorie uitgebreid zou kunnen worden om de affiniteiten van remmers over de hele eiwitfamilie te voorspellen.

Hoofdstuk 8 bouwt voort op de principes die in Hoofdstuk 7 werden geïntroduceerd, maar concentreert zich op de grote familie van de kinases. Van deze eiwitfamilie zijn grote datasets beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur die het mogelijk maken om automatisch lerende algoritmes zoals beschreven in het vorige hoofdstuk toe te passen. Ook de kinasefamilie liet zich uitstekend in kaart brengen met behulp van t-SNE, en toonde hierin sterke overeenkomsten met een eerder gepubliceerde kinasestamboom.¹³ De stoffen die opgenomen zijn in de *Published Kinase Inhibitor Set* gecombineerd met de biologische data die beschikbaar is voor ± 200 kinases, vormden de basis voor de oefendata die gebruikt werd om het hier ontwikkelde *Drug Discovery Maps* model te onderwijzen.^{14,15} Dit model werd gevalideerd aan de hand van de data van Karaman *et al.* en toonde zich evenwaardig of superieur aan geavanceerde computertechnieken als kwantitatieve structuur-activiteitsrelaties en proteochemometrische modellen.¹⁶ Het ontwikkelde model werd toegepast in een virtuele zoektocht naar nieuwe FLT3-remmers. Een correct voorspelde ratio van 41% werd behaald, met 18 van de 44 voorspelde remmers inderdaad actief. Twee van deze stoffen werden gesynthetiseerd en getest in MV4:11 celculturen en beide bleken cellulair (zeer) actief. De andere kinases die voorspeld waren als doeleiwit van deze moleculen werden ook getest. Hieruit bleek dat ongeveer 70% van deze eiwitten inderdaad geremd werden. Tot slot werd het model gebruikt om de interactieprofielen te voorspellen van een commercieel verkrijgbare set stoffen die een motief bevatten, die de zogenaamde scharnierregio van kinases zou kunnen binden. Twintig stoffen hiervan werden gekocht en getest op hun activiteit tegen de kinases HIPK3 en PAK2. Helaas bleek geen van deze stoffen daadwerkelijk te werken, wat mogelijk te wijten is aan de lage dekkinggraad van de oefendata rond deze doeleiwitten, of de matige vergelijkbaarheid tussen de moleculen in de oefendata en die in de commerciële bibliotheek.

Tot slot

Minder dan 1 op 10 kandidaat medicijnen die beginnen aan fase 1 klinische studies worden uiteindelijk goedgekeurd voor menselijk gebruik. Onverwachte bijwerkingen en toxiciteit zijn hier mede debet aan. Een beter begrip van de rol van selectiviteit en een beter inzicht in welke eiwitten daadwerkelijk door kandidaat medicijnen worden gebonden, kunnen bijdragen aan het voorkomen dat kandidaat medicijnen om deze redenen niet verder ontwikkeld worden. Dit proefschrift heeft enkele van deze uitdagende aspecten van de medicijnontwikkeling bestudeerd. Het gebruik van activiteit-gebaseerde eiwit profilering zoals in Hoofdstukken 2 en 3 tijdens medicijnontwikkeling en -optimalisatie, en in Hoofdstukken 5 en 6 om de interacties van een kandidaat medicijn in kaart te brengen, illustreert de veelzijdigheid en het belang van deze techniek uit de chemische biologie. Gecombineerd met de kennis verkregen uit biochemische analyses, zoals die ontwikkeld in Hoofdstuk 4, kan de medicinaal chemicus veel aan ABPP hebben. De recente enorme toename in de populariteit van zelflerende algoritmes, ondersteund door de exponentiële groei van beschikbare biologische data, biedt grote kansen voor de medicijnontwikkeling. Hoofdstukken 7 en 8 toonden de toepasbaarheid van één van die algoritmes aan, welke in staat bleek redelijk betrouwbare voorspellingen te doen over interactieprofielen van kinaserepressoren. De moeilijkheden in het vinden, bepalen en voorspellen van selectiviteit zijn verre van opgelost, maar door ons begrip van de binding van remmers aan eiwitten, bedoeld of onbedoeld, te blijven uitbreiden, kunnen werkelijk selectieve remmers wellicht ooit werkelijkheid worden.

Citations

1. Croston, G. E. The utility of target-based discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 427–429 (2017).
2. Bowes, J. *et al.* Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 909–922 (2012).
3. Baggelaar, M. P. *et al.* Development of an Activity-Based Probe and In Silico Design Reveal Highly Selective Inhibitors for Diacylglycerol Lipase- α in Brain. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 12081–12085 (2013).
4. Baggelaar, M. P. *et al.* Highly Selective, Reversible Inhibitor Identified by Comparative Chemoproteomics Modulates Diacylglycerol Lipase Activity in Neurons. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8851–8857 (2015).
5. Ogasawara, D. *et al.* Rapid and profound rewiring of brain lipid signaling networks by acute diacylglycerol lipase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 26–33 (2016).
6. Baggelaar, M. P. *et al.* Chemical Proteomics Maps Brain Region Specific Activity of Endocannabinoid Hydrolases. *ACS Chem. Biol.* **12**, 852–861 (2017).
7. Janssen, F. J. Discovery of sulfonyl-1,2,4-triazole ureas as DAGL α inhibitors by HTS-ABPP. in *Discovery of novel inhibitors to investigate diacylglycerol lipases and α/β -hydrolase domain 16A* 109–139 (2016).
8. Kuzmič, P. DynaFit—a software package for enzymology. *Methods Enzymol.* **467**, 247–80 (2009).
9. Johnson, D. S. *et al.* Discovery of PF-04457845: A Highly Potent, Orally Bioavailable, and Selective Urea FAAH Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 91–96 (2011).
10. Cisar, J. S. *et al.* Identification of ABX-1431, a Selective Inhibitor of Monoacylglycerol Lipase and Clinical Candidate for Treatment of Neurological Disorders. *J. Med. Chem.* **61**, 9062–9084 (2018).
11. Brindisi, M. *et al.* Development and Pharmacological Characterization of Selective Blockers of 2-Arachidonoyl Glycerol Degradation with Efficacy in Rodent Models of Multiple Sclerosis and Pain. *J. Med. Chem.* **59**, 2612–2632 (2016).
12. Bachovchin, D. A. *et al.* A high-throughput, multiplexed assay for superfamily-wide profiling of enzyme activity. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 656–663 (2014).
13. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
14. Drewry, D. H., Willson, T. M. & Zuercher, W. J. Seeding collaborations to advance kinase science with the GSK Published Kinase Inhibitor Set (PKIS). *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 340–2 (2014).
15. Elkins, J. M. *et al.* Comprehensive characterization of the Published Kinase Inhibitor Set. *Nat. Biotechnol.* **34**, 95–103 (2015).
16. Karaman, M. W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **26**, 127–132 (2008).