



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Small molecule inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT)

Gao, Y.

### Citation

Gao, Y. (2021, September 29). *Small molecule inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT)*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3213827>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3213827>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

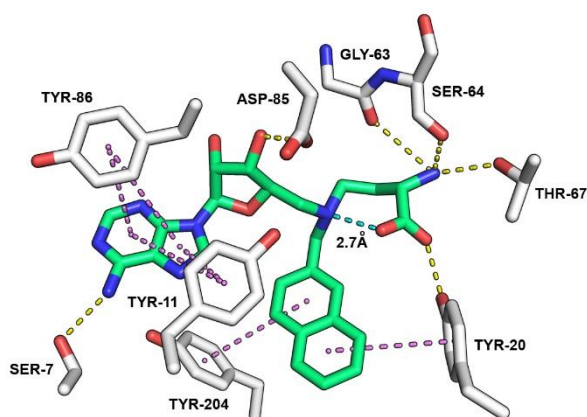
## Samenvatting

De functie van NNMT in gezonde toestand en in ziekten heeft de laatste jaren meer aandacht gekregen. Overexpressie van NNMT is waargenomen in verschillende kankers, en verhoogde NNMT expressie is gerelateerd aan tumorprogressie, metastase, en slechtere klinische resultaten. NNMT wordt beschouwd als een nieuw potentieel farmacologisch doelwit in de behandeling van een verscheidenheid van kankers, stofwisselingsziekten en andere pathologieën. Het toenemend aantal publicaties waarin de rol van NNMT bij ziekten wordt opgehelderd, heeft op zijn beurt de ontwikkeling van krachtige en selectieve remmers van NNMT gestimuleerd, waarbij in de afgelopen vijf jaar een toenemend aantal verbindingen is onthuld.

**Hoofdstuk 1** geeft een uitgebreid overzicht van de huidige status van de ontwikkeling van NNMT remmers, relevante *in vitro* en *in vivo* studies, en een bespreking van de uitdagingen waar men bij de ontwikkeling van NNMT remmers voor staat. Hoewel de zoektocht naar effectieve NNMT-remmers nog in de kinderschoenen staat, zijn er belangrijke successen geboekt bij het identificeren van krachtige en selectieve kleine molecuul remmers van NNMT. De beperkte cellulaire en *in vivo* activiteit van deze verbindingen wijst echter op de noodzaak om meer geneesmiddel-achtige remmers te ontwikkelen. Het klinisch belang van NNMT bij verschillende ziekten, waaronder kanker en stofwisselingsstoornissen, ondersteunt het als een veelbelovend therapeutisch doelwit. De momenteel beschikbare reeks NNMT-remmers kent echter vele beperkingen. De adenosine- en aminozuurgroepen van de SAM-mimetica worden beschouwd als kritische groepen in NNMT-remmers. Hoewel deze eigenschappen cruciaal zijn voor de activiteit, hebben zij ook een negatieve invloed op cel-permeabiliteit. Om de therapeutische levensvatbaarheid van NNMT-remming beter te kunnen beoordelen, moet de huidige reeks beschikbare NNMT-remmers worden uitgebreid om meer geneesmiddel-achtige moleculen te kunnen leveren.

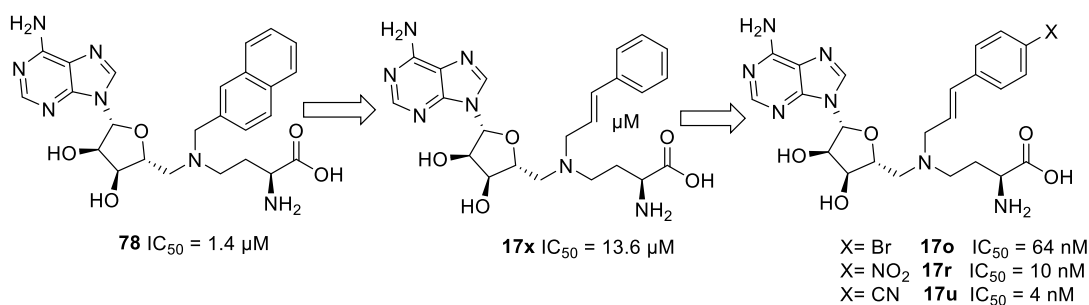
In **hoofdstuk 2** werd een gevarieerde bibliotheek van remmers geprepareerd om de verschillende gebieden van de NNMT bindingsplaats te onderzoeken. Daartoe werden verschillende structurele motieven onderzocht op hun vermogen om de potentie en binding binnen de NNMT bindingsplaats te verbeteren. Van de bereide bisubstraat-analogen bleek naftaleen-verbinding **78** de krachtigste NNMT-remmer te zijn, met een IC<sub>50</sub>-waarde van 1,41  $\mu$ M, >10 maal beter dan voorloper **MvH45** (verbinding **1** in **hoofdstuk 2**). Uit modelleerstudies blijkt dat de verbeterde activiteit van verbinding **78** beredeneerd kan

worden door de schijnbare aanwezigheid van een intramoleculaire waterstofbruginteractie die de verbinding voorbestemt tot een actieve conformatie met lagere entropische kosten. Bovendien blijkt uit de modellering dat de naftaleengroep in **78** correct georiënteerd is om te profiteren van extra  $\pi$ - $\pi$  stacking interacties met verschillende tyrosineresiduen in de nicotinamidebindingsplaats in NNMT (**Figuur 1**). De cellulaire gegevens die zijn verkregen voor verbinding **78** laten een dosis-afhankelijk effect zien op de celproliferatie in HSC-2 mondkankercellen.



**Figuur 1.** Modelleringsresultaten voor verbinding **78** in de actieve site van NNMT (PDB ID: 3ROD). Moleculaire dynamica simulatie toont de aanwezigheid van een intramoleculaire waterstofbrug (2.7Å, aangegeven in cyaan) specifiek voor verbinding **78** (in groen)

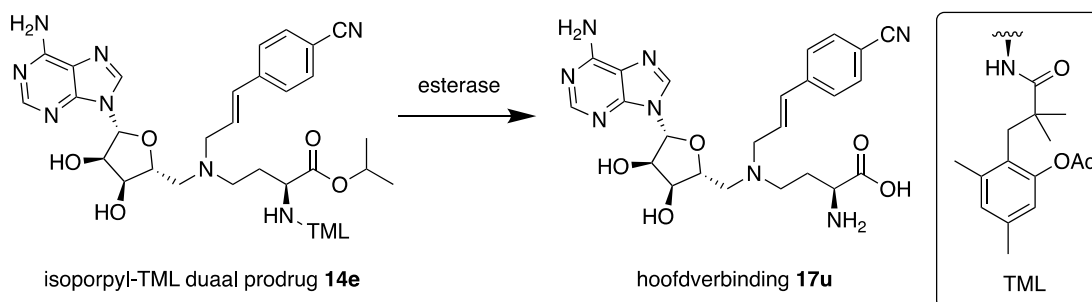
In **hoofdstuk 3** wordt verslag gedaan van een scaffold-hopping strategie om nieuwe en krachtige bisubstraat NNMT remmers te genereren (**17o**, **17r**, **17u**, **figuur 2**). De inhibitiegegevens van de aldus bereide remmers onthulden een opvallend effect voor elektron-onttrekkende groepen aanwezig op de aromatische ring, voornamelijk wanneer ze worden ingebracht op de positie *para* van de alkeenlinker. Onder deze verbindingen werd de *para*-cyano gesubstitueerde styreen-gebaseerde remmer **17u** geïdentificeerd als de meest krachtige NNMT-remmer met een  $IC_{50}$ -waarde van 3,7 nM. Deze studies toonden aan dat kleine veranderingen in de aminozuurzijketen en het adenosinedeelte tot opmerkelijke verminderingen van de potentie leiden. Modelleerstudies voorspellen de aanwezigheid van waterstofbruginteracties tussen de *para*-cyanogroep en twee actieve serine residuen in de nicotinamide bindingsplaats van NNMT, wat een mogelijke verklaring biedt voor de potentie van verbinding **17u**. Opmerkelijk is dat de krachtige remming die **17u** in biochemische tests vertoonde, niet werd waargenomen in celgebaseerde testen;



**Figuur 2.** Scaffold-hopping strategie om nieuwe en krachtige bisubstraatremmers te genereren.

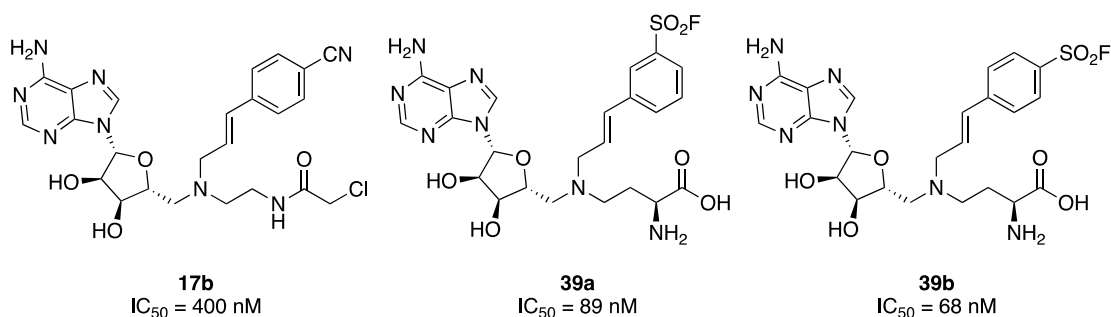
alleen bij een zeer hoge concentratie van  $100 \mu M$  werd een afname van de levensvatbaarheid van de cellen waargenomen bij cellijnen voor mond-, long- en blaaskanker die met de verbinding werden behandeld.

In **hoofdstuk 4** wordt een prodrug strategie beschreven om de polariteit van verbinding **17u** te verlagen en de cellulaire activiteit te verbeteren. Meer specifiek werd het carboxylzuur op remmer **17u** gemaskeerd als een ester met behulp van een verscheidenheid aan alkyl- en benzylgroepen, en het aminegedeelte werd gemaskeerd met behulp van de trimethyl-lock (TML) groep. De verschillende combinaties van esterase-splitsbare prodrugs die zo werden bereid leidden tot de selectie van de isopropyl prodrug **12e** en de isopropyl-TML dual prodrug **14e** (**figuur 3**) als de verbindingen met het meest veelbelovende profiel wat betreft stabiliteit en cellulaire activiteit. Aanvankelijk werden de verbindingen getest in een MTT-cellevensvatbaarheidstest met drie verschillende kankercellijnen, maar de cellulaire activiteit werd alleen waargenomen bij de hoogst geteste concentratie van  $100 \mu M$ . Vervolgens werd een cellulaire MNA bepalingstest uitgevoerd, waarbij een dosisafhankelijk effect van de NNMT prodrug remmers **12e** en **14e** op de hoeveelheid MNA in de cellen werd aangetoond, met een significante verbetering ten opzichte van de hoofdverbinding. De hier gepresenteerde gegevens tonen de geschiktheid aan van een prodrugstrategie om polaire NNMT-remmers in cellen af te leveren.



**Figuur 3.** Hydrolyse van prodrug **14e** om hoofdverbinding **17u** te vormen.

In **hoofdstuk 5** wordt het ontwerp en de synthese beschreven van een bibliotheek van verbindingen die zich richten op de covalente interactie met actieve site cysteine en serine residuen met behulp van verschillende functionele groepen. Hiertoe werd de aminozuurzijketen in de krachtige NNMT-remmer **17u** (geïdentificeerd in **hoofdstuk 3**) vervangen door een acrylamide of chlooracetamide fragment met verschillende linkers om cysteïneresiduen C159 en C165 aan te pakken, waarvoor covalente remmers al eerder zijn beschreven. De meest actieve verbinding (**17b**, **figuur 4**) die aldus werd bereid, vertoonde een  $IC_{50}$ -waarde van 400 nM, waardoor dit het eerste voorbeeld is van een bisubstraatremmer waarin de aminozuurzijketen met succes werd vervangen zonder dat het inactief werd. In een andere benadering werd de cyanogroep van verbinding **17u** vervangen door hetzij een sulfonylfluoride, hetzij een boronzuurgroep, met als doel de serineresiduen S201 of S213, die aanwezig zijn in de nicotinamide bindingsplaats van NNMT, aan te pakken. Deze inspanningen leidden tot een krachtige remming van NNMT door de *meta*- en *para*-sulfonylfluorideverbindingen **39a** ( $IC_{50} = 89$  nM) en **39b** ( $IC_{50} = 68$  nM, **figuur 4**). Interessant is dat het significante verschil in activiteit dat werd waargenomen voor *meta*- versus *para*-substitutie, besproken in **hoofdstuk 3**, niet werd waargenomen voor de sulfonylfluoriden. De boronzuurverbindingen vertoonden een matige activiteit voor de *meta*-substitutie, terwijl geen remming werd waargenomen voor *para*-gesubstitueerd boronzuur. Modelleringsgegevens van verbindingen **39a-b** suggereren dat de afstand van 2.9 en 3.4 Å tussen de sulfonylfluoride groep en de hydroxylen van serine residuen S201 en S213 een covalente interactie mogelijk zou kunnen maken. Studies om het werkingsmechanisme van verbindingen **17b**, **39a** en **39b** te onthullen zijn aan de gang.



**Figuur 4.** Chemische structuur van verbindingen **17b**, **39a** en **39b**.