



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery of selective diacylglycerol lipase β inhibitors

Zhu, N.

Citation

Zhu, N. (2024, May 22). *Discovery of selective diacylglycerol lipase β inhibitors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3754188>

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/1887/3754188>

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

Nederlandse Samenvatting

Het onderzoek beschreven in deze scriptie onderzoekt op een systematische methode het ontwerp, de synthese en de biologische evaluatie van remmers voor diacylglycerol lipase β (DAGL β). Via high-throughput screening en structuur-activiteitsrelatie studies werden selectieve DAGL β -remmers met cellulaire activiteit ontwikkeld. Als eerste selectieve DAGL β -remmers bieden deze verbindingen ons de mogelijkheid om de functies van DAGL β beter te begrijpen en de eventuele therapeutische toepassing te onderzoeken.

Hoofdstuk 1 geeft voornamelijk een overzicht van het endocannabinoïde systeem (ECS) en van de activiteits-gebaseerde probes (ABPs) en kleine moleculaire remmers van enzymen binnen het ECS, evenals de biologische functies en potentiële klinische toepassingen van deze enzymen. Het ECS omvat endocannabinoïden (2-arachidonoylglycerol (2-AG) en *N*-arachidonylethanolamine (AEA)) en cannabinoïde receptoren type 1 en 2 (CB₁R en CB₂R). Bovendien omvat het enzymen zoals diacylglycerol lipase α en β (DAGL α/β) en *N*-acylfosfatidylethanolaminefosfolipase D (NAPE-PLD), die verantwoordelijk zijn voor de respectieve synthese van 2-AG en AEA, en enzymen zoals monoacylglycerol lipase (MAGL) en vetzuuramidehydrolase (FAAH), die verantwoordelijk zijn voor de respectieve hydrolyse van 2-AG en AEA. Het ECS is betrokken bij het reguleren van verschillende biologische processen, waaronder synaptische plasticiteit, geheugenvorming en cognitie, emoties, energiemetabolisme, pijnperceptie en de immuunrespons. Om de biologische functies van enzymen in het ECS te bestuderen, zijn talloze ABPs en remmers ontwikkeld. Momenteel zijn er twee types breedspectrum ABPs tegen serine hydrolases: op fluorofosfonaat gebaseerde en op β -lacton gebaseerde probes. Deze probes kunnen de meeste enzymen in het ECS labelen, waarmee de ontdekking van nieuwe remmers en de evaluatie van de selectiviteit mogelijk is. Dankzij het gebruik van deze probes in activity-based protein profiling (ABPP) zijn veel potente en selectieve remmers ontdekt voor ECS-enzymen. Voorbeelden van remmers zijn onder andere, maar niet beperkt tot, DH376, een triazol-ureum gebaseerde DAGL α/β -remmer; LEI-401, een pyrimidine-4-carboxamide gebaseerde NAPE-PLD-remmer; Lu AG06466, een carbamaat gebaseerde MAGL-remmer; en PF-04457845, een pyridazine ureum gebaseerde FAAH-remmer.

Waar MAGL- en FAAH-remmers momenteel klinisch getest worden, worden DAGL- en NAPE-PLD-remmers momenteel onderzocht in diermodellen. De MAGL-remmer Lu AG06466, bleek in klinische proeven over het algemeen veilig, maar was niet effectief in het verminderen van tics en bijkomende symptomen bij patiënten met het syndroom van Tourette tijdens een fase 2 klinische proef. De FAAH-remmer PF04457845 vertoonde positieve effecten in een fase 2a studie bij patiënten met een cannabis verslavingsstoornis. Een andere FAAH-remmer, JNJ-42165279, wordt momenteel klinisch onderzocht voor de behandeling van posttraumatische stressstoornis. Bij remming van DAGL zijn ontstekingsremmende en pijnstillende effecten waargenomen. Echter, het remmen van DAGL α in de hersenen kan mogelijk leiden tot psychiatrische bijwerkingen. De NAPE-PLD-remmer LEI-401 bleek de

hypothalamus-hypofyse-bijnier-as te activeren en tot chronische angst te leiden in muizen. In deze context kunnen tot de periferiebeperkte remmers essentiële hulpmiddelen zijn om de functies van ECS-enzymen in perifere weefsels op te helderen en kunnen ze nieuwe klinische toepassingen hebben.

Selectieve DAGL β -remmers zijn cruciaal om de specifieke biologische functies van dit enzym en het onderscheid tussen DAGL β en DAGL α onder specifieke pathofysiologische omstandigheden te begrijpen, maar zijn vooralsnog niet beschikbaar. Bovendien kunnen selectieve DAGL β -remmers een rol spelen in de behandeling van ontstekingsziekten, met mogelijk minimale bijwerkingen in het centrale zenuwstelsel. Daarom is het hoofddoel van het onderzoek dat in deze scriptie wordt beschreven, de ontwikkeling van selectieve DAGL β -remmers.

In **Hoofdstuk 2** werd een fluorescerentie assay met behulp van het EnzChek-lipasesubstraat geoptimaliseerd voor DAGL α/β en geminiaturiseerd naar een 384-wells plaatformaat. Deze assay werd vervolgens toegepast in een high-throughput screening met gebruik van het gezuiverde katalytische domein van DAGL β om nieuwe potentiële verbindingen te identificeren. Een bibliotheek van 12.560 serine hydrolaseremmers van Enamine en een in-house bibliotheek van 27 glycinesulfonamiden werden gescreend bij 10 μ M. Na primaire en bevestigende screenings, deselectie en dosisresponsbepaling werden acht hits geïdentificeerd, onderverdeeld in vier chemotypen. Hit **1**, gebaseerd op glycinesulfonamide, ook bekend als LEI-106, vertoonde de hoogste activiteit voor DAGL β met een negatieve logaritme van de halfmaximale remmende concentratie (pIC_{50}) van 6.69 ± 0.14 en veelbelovende fysisch-chemische eigenschappen, maar was niet selectief ten opzichte van DAGL α (pIC_{50} van 7.35 ± 0.06).

In **Hoofdstuk 3** werd een uitgebreide structuur-activiteitsrelatie van glycinesulfonamiden als DAGL-remmers verkend door systematische aanpassingen aan verschillende delen van dit chemotype. In totaal werden 51 analogen gesynthetiseerd en biochemisch geëvalueerd. Waar de meeste verbindingen die in dit hoofdstuk worden besproken, vergelijkbare activiteit vertoonden voor beide DAGL-isoformen of lichte selectiviteit voor DAGL α , vertoonden drie verbindingen met variaties in het sulfonyl-substituent enige selectiviteit voor DAGL β . Dit suggereert dat het sulfonyl-deel een modificatie-hotspot is om selectiviteit voor DAGL β te bereiken.

In **Hoofdstuk 4** werd een diepgaande structuur-activiteitsrelatie-studie uitgevoerd om de selectiviteit voor DAGL β te verbeteren, met de focus op het derivatiseren van het sulfonyl-substituent van het glycinesulfonamide-chemotype. Deze inspanning leidde tot de identificatie van 3,4-dihydro-2*H*-benzo[*b*][1,4]dioxepine als de optimale zijgroep op deze positie. Verdere optimalisatie van de activiteit en selectiviteit omvatte het verkennen van andere componenten van dit chemotype, resulterend in de ontdekking van zes verbindingen met een pIC_{50} tot 8.08 ± 0.13 , een selectiviteitsvouw tot 51 ten opzichte van DAGL α en veelbelovende fysiochemische eigenschappen.

In **Hoofdstuk 5** werd een op fluorescentie gebaseerde 96-wells plaatformaat assay opgezet met behulp van een op GPCR-activatie-gebaseerde endocannabinoïde-sensor (GRAB_{eCB2.0}) om de cellulaire activiteit van DAGL-remmers te bepalen. Deze sensor bestaat uit een CB₁-receptor gekoppeld aan een circulair gepermuteerd verbeterd groen fluorescerend eiwit (cpEGFP die kan worden geactiveerd door de binding van endocannabinoïden om fluorescentie op te wekken. De GRAB_{eCB2.0}-sensor tot expressie gebracht in Neuro2A-cellen fluoresceerde door ATP geïnduceerde productie van 2-AG. In totaal werden 23 DAGL-remmers geprofileerd in deze assay, waarbij een concentratieafhankelijke vermindering van de productie van 2-AG werd aangetoond. Hieruit bleek dat DAGL α de primaire isoform is die betrokken is bij door ATP gestimuleerde 2-AG-productie in Neuro2A-cellen.

In **Hoofdstuk 6** werden representatieve DAGL β -selectieve remmers **LEI-130** en **LEI-131**, samen met een negatieve controle, **LEI-132**, geprofileerd in *in vitro*- en *in situ*-studies. Onderzoek naar de bindingswijze onthulde een niet-competitief mechanisme voor LEI-130 en LEI-131 tegen DAGL β , wat wijst op hun binding aan een allosterische pocket. *In vitro*- en *in situ*-ABPP-studies bevestigden de selectiviteit van LEI-130 en LEI-131 tegen DAGL β ten opzichte van de aanwezige eiwitten in muizenhersenen en levende cellen. Lipidomics-analyse van LEI-130, LEI-131 en LEI-132 in N9 microglia- en J774A.1 macrofaagcellen toonde aan dat DAGL β de niveaus van 2-AG evenals downstream lipiden reguleerde op een celtype-afhankelijke manier. Ook werd aangetoond dat LEI-130, LEI-131 en LEI-132 allemaal de door LPS gestimuleerde cytokineproductie verminderden, wat wijst op de aanwezigheid van een onbekend off-target dat betrokken is bij het reguleren van dit proces.

In **Hoofdstuk 7** wordt het werk dat in deze scriptie wordt gepresenteerd, samengevat en worden nieuwe richtingen voor toekomstig onderzoek aangegeven.