



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).

Summary in Chinese

中文总结

该论文对二酰甘油酯酶 β (DAGL β) 抑制剂的设计、合成和生物学评价进行了系统研究。通过高通量筛选以及构效关系研究, 发现了具有细胞活性的 DAGL β 选择性抑制剂。作为突破性的同类第一的 DAGL β 选择性抑制剂, 这些化合物能够推动我们对于 DAGL β 生物学功能的理解, 并揭示其潜在的临床应用价值。

第一章主要概述了内源性大麻素系统 (ECS), 针对内源性大麻素系统中的酶的活性探针和小分子抑制剂, 以及靶向这些酶的生物学功能和其潜在的临床应用价值。ECS 包括内源性大麻素 (2-花生四烯酰甘油 (2-AG) 和 *N*-花生四烯酰乙醇胺 (AEA)) 以及大麻素受体类型 1 和 2 (CB₁R 和 CB₂R)。此外, 它还包括: 内源性大麻素合成酶, 如二酰甘油酯酶 α/β (DAGL α/β) 和 *N*-酰基磷脂醇胺磷脂酶 D (NAPE-PLD), 它们分别负责 2-AG 和 AEA 的合成; 内源性大麻素降解酶, 如单酰甘油酯酶 (MAGL) 和脂肪酸酰胺水解酶 (FAAH), 它们分别负责 2-AG 和 AEA 的水解。内源性大麻素系统参与各种生物过程的调节, 包括突触可塑性、记忆形成和学习、情绪、能量代谢、疼痛感知和免疫反应。为了研究内源性大麻素系统中的酶的生物学功能, 研究人员开发了许多活性探针和小分子抑制剂。到目前为止, 广谱活性探针可分为两种: 基于氟磷酸酯的探针和基于 β -内酯的探针。这些探针可以标记内源性大麻素系统中的大多数酶以及其他丝氨酸水解酶, 从而实现新型抑制剂的发现和选择性评估。得益于这些探针在活性蛋白质分析中的应用, 许多针对内源性大麻素系统中的酶的强效和选择性抑制剂已经被开发。代表性的抑制剂包括但不限于 DH376 (一种基于三唑脲的 DAGL α/β 抑制剂)、LEI-401 (一种基于嘧啶-4-羧酰胺的 NAPE-PLD 抑制剂)、Lu AG06466 (一种基于碳酸酯的 MAGL 抑制剂) 以及 PF-04457845 (一种基于吡嗪脲的 FAAH 抑制剂)。

MAGL 和 FAAH 抑制剂已经进入临床试验, DAGL 和 NAPE-PLD 抑制剂目前则正处于动物模型研究。MAGL 抑制剂 Lu AG06466 在临床试验中表现出普遍的安全性, 但在第 2 期临床试验中, 对于降低抽动症患者的抽动、先兆冲动和合并症的疗效并不显著。FAAH 抑制剂 PF 04457845 在针对大麻使用障碍的第 2a 期临床研究中显示出积极效果。另一种 FAAH 抑制剂 JNJ-42165279 目前则正处于针对创伤后应激障碍的临床研究。DAGL 抑制剂显示出抗炎和镇痛效果。然而, 抑制大脑中的 DAGL α 可能导致精神性的副作用。NAPE-PLD 抑制剂 LEI-401 被发现能激活下丘脑-垂体-肾上腺轴, 并损害小鼠的恐惧消退。在这种情况下, 外周限制的抑制剂将是阐明这些酶在外周组织中的功能的重要工具, 并可能具有新的临床应用价值。

DAGL β 选择性抑制剂对于理解该酶的独特生物学功能，以及在特定病理生理条件下区分 DAGL β 和 DAGL α 的作用至关重要，但目前仍然缺乏这样的抑制剂。此外，DAGL β 选择性抑制剂在治疗炎症性疾病方面具有潜在的应用价值，并同时能够最小化对中枢神经系统的副作用。因此，该论文的主要研究目标是开发 DAGL β 选择性抑制剂。

第二章介绍了一种基于荧光测定 DAGL α/β 活性的方法。该方法使用 EnzChek 脂肪酶底物，经过优化和小型化后使其适用于 384 孔板。随后，该方法被应用于高通量筛选以鉴定出可以抑制 DAGL β 的活性化合物。对从 Enamine 购买的 12,560 个丝氨酸水解酶抑制剂和来自内部化合物库的 27 个甘氨酸磺酰胺类似物以 10 微摩尔的浓度进行筛选，经过初步筛选、确认筛选、去除抑制荧光信号的化合物和化合物的剂量-反应关系测定，一共得到了 8 个分属于 4 种化学类型的活性化合物。其中基于甘氨酸磺酰胺的活性化合物 **1**，也被称为 LEI-106，对 DAGL β 表现出最高的活性。它对 DAGL β 的半数抑制浓度的负对数 (pIC_{50}) 为 6.69 ± 0.14 ，并且具有良好的物理化学性质。但是该化合物对 DAGL β 不具有选择性，因为它对 DAGL α 也表现出高活性，其对 DAGL α 的 pIC_{50} 值为 7.35 ± 0.06 。

第三章通过对活性化合物 **1** 的不同部分进行结构改造，探索了甘氨酸磺酰胺作为 DAGL 抑制剂的构效关系。在此章中，共合成了 51 个甘氨酸磺酰胺类似物并对它们进行了生物化学活性评估。虽然本章讨论的大多数化合物对两个 DAGL 亚型表现出相似的活性或对 DAGL α 表现出轻微的选择性，但是其中三个具有不同磺酰基取代基的化合物表现出对 DAGL β 的一定选择性。这表明磺酰基部分是实现 DAGL β 选择性的修饰位点。

第四章对构效关系进行了更深入的研究，旨在提高抑制剂的 DAGL β 选择性。该研究的重点是对甘氨酸磺酰胺的磺酰基取代基进行优化。这一研究发现了 3,4-二氢-2*H*-苯并[*b*][1,4]二氧杂环庚烷为在这个位置上的最佳取代基。随后，该研究对这一类型的其他结构部分进行探索以进一步优化活性和选择性，最终得到了 6 个具有良好活性、选择性和理化特性的化合物。

第五章介绍了一种基于荧光的 96 孔板细胞活性测定方法。该方法使用基于 G 蛋白偶联受体的内源性大麻素传感器 (GRAB $_{\text{eCB2.0}}$)，对 DAGL 抑制剂的细胞活性进行了研究。该传感器是经环化增强绿色荧光蛋白 (cpEGFP) 修饰的 CB $_1$ R 受体，其能与内源性大麻素结合并被激活而产生荧光。在小鼠神经母细胞瘤细胞 (Neuro2A) 中表达的 GRAB $_{\text{eCB2.0}}$ 可以对三磷酸腺苷 (ATP) 诱导产生的 2-AG 做出反应。在此实验中，共对 23 个 DAGL 抑制剂进行了活性测试，结果表明这些抑制剂对于抑制 2-AG 的产生具有不同的效力。值得注意的是，相关性分析揭示了在 Neuro2A 细胞中，ATP 诱导的 2-AG 的产生主要依赖于 DAGL α 而非 DAGL β 。

第六章对代表性的 DAGL β 选择性抑制剂 **LEI-130** 和 **LEI-131**，以及阴性对照化合物 **LEI-132**，进行了体外和原位研究。抑制模式研究揭示了 LEI-130 和 LEI-131 对 DAGL

β 的抑制是非竞争性的 (noncompetitive), 表明了它们是结合在 DAGL β 的异构口袋中。LEI-130 和 LEI-131 的体外和原位活性蛋白质分析研究证实了它们可以有效地抑制 DAGL β 的活性, 并对小鼠脑蛋白质组和活细胞中的一系列丝氨酸水解酶的活性没有影响。N9 小胶质细胞和 J774A.1 巨噬细胞经过化合物 LEI-130、LEI-131 以及 LEI-132 处理后, 对其脂质水平和细胞因子水平进行分析。实验结果表明 DAGL β 以一种依赖于细胞类型的方式调控 2-AG 及其下游脂质的水平。有趣的是, LEI-130、LEI-131 和 LEI-132 都能够减弱脂多糖 (LPS) 诱导的细胞因子的产生, 表明可能除 DAGL β 外有未知的非靶标蛋白参与了这一过程调控。

第七章对本论文的研究成果进行了归纳和总结, 并提供了未来研究的新方向。