

University of Groningen

## Discovery of Inhibitors by Combinatorial-Chemistry Approaches

van der Vlag, Ramon

DOI:  
[10.33612/diss.146091529](https://doi.org/10.33612/diss.146091529)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
van der Vlag, R. (2020). *Discovery of Inhibitors by Combinatorial-Chemistry Approaches*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.146091529>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## **Chapter 7**

Samenvatting en Toekomstperspectief

## 7.1 Samenvatting

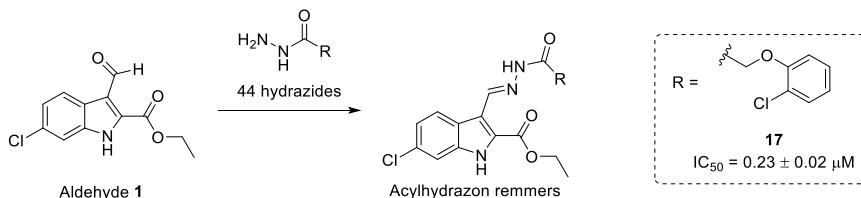
De zoektocht naar nieuwe medicijnen begint meestal met het testen van gesynthetiseerde of uit de natuur geïsoleerde moleculen. Na het identificeren van een hit zijn meerdere iteratieve rondes van synthese en biochemische evaluatie van moleculen nodig. Naast het feit dat de ontdekking van mogelijke remmers erg onzeker is, kost het proces veel tijd, geld, energie en (chemische) grondstoffen. In dit proefschrift hebben we ons geconcentreerd op het vinden en optimaliseren van methoden om nieuwe remmers te ontdekken. Door middel van combinatoriële chemie met acylhydrazonen, een getrachte kinetisch doelwit-gerichte synthese (KDGS) via reductieve aminering en een dynamisch combinatoriële chemie (DCC) methode hebben we meerdere remmers van enzymen ontwikkeld.

Gedurende onze onderzoeksprojecten hebben we met drie verschillende enzymen gewerkt: 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1), muis double minute 2 (MDM2) en macrofaag migratie inhibitie factor (MIF). Ondanks de grote verschillen tussen de eiwitten, kunnen ze met elkaar in verband worden gebracht: MIF is een cytokine die interactie aangaat met talrijke receptoren en eiwitten. Eén van deze eiwitten is p53, een tumor-onderdrukkend eiwit dat geactiveerd wordt door cellulaire stress of schade en leidt tot een stop van celvermenigvuldiging, apoptose en DNA-reparatie. MDM2 is de negatieve regulator van het p53-eiwit en overexpressie leidt tot verlies van de p53-functies. Doordat MIF de eiwit-eiwit interacties tussen p53 en MDM2 stabiliseert, is het een belangrijke modulator in signaaltransductie. Humaan 15-LOX-1 is een lipoxygenase en speelt een belangrijke regulerende rol in verschillende aandoeningen van het centrale zenuwstelsel en in longziekten. Het enzym zet arachidonzuur en linolzuur om in peroxideradicaal bevattende vetzuren, welke oxidatieve stress veroorzaken en kunnen leiden tot ferroptose. De vetzuren kunnen verder omgezet worden in inflammatoire signaalmoleculen, welke belangrijke regulerende rollen hebben in vele ziekten. MIF heeft ook verschillende ontstekingsveroorzakende functies en zowel MIF als 15-LOX-1 spelen daardoor een rol in bijvoorbeeld astma. In dit proefschrift wordt het volgende besproken:

In **Hoofdstuk 1** worden recente ontwikkelingen in DCC besproken met een speciale focus op analytische methoden. Eerst worden het concept van DCC, de algemene voorwaarden en mogelijkheden besproken. Aan de hand van recente literatuurvoorbeelden worden vervolgens alle veelgebruikte analytische technieken behandeld, zoals chromatografie, kernspinresonantie (NMR) spectroscopie, massaspectrometrie, fluorescentiespectroscopie en röntgendiffractie. Ten slotte wordt een aangepaste versie van DCC, genaamd tethering, bekeken.

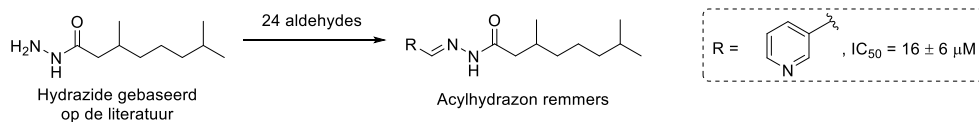
**Hoofdstuk 2** beschrijft een door ons ontwikkelde combinatoriële methode gebaseerd op acylhydrazone chemie voor het vinden van nieuwe 15-LOX-1 remmers. Hierbij richten we ons niet alleen op het optimaliseren van de inhibitie, maar ook op het verbeteren van de fysisch-chemische eigenschappen. Een indoolaldehyde hit, welke eerder was gevonden in een fragmentscreening, wordt gekoppeld aan 44 verschillende hydrazides (Schema 1). De bibliotheek wordt vervolgens getest op 15-LOX-1, wat vier veelbelovende hits geeft. Deze hits, evenals geselecteerde andere verbindingen, worden daarna los gesynthetiseerd, gezuiverd en opnieuw getest op het enzym. Van drie van deze nieuwe remmers is de IC<sub>50</sub>-waarde lager dan 0.5 µM. Eén verbinding, acylhydrazone **17**, heeft een IC<sub>50</sub>-waarde van

$0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$ , valt in een interessante structuur-activiteitsrelatie (SAR) en heeft een verbeterde lipofiele ligandefficiëntie (LLE) ten opzichte van een voorheen gerapporteerde verbinding.



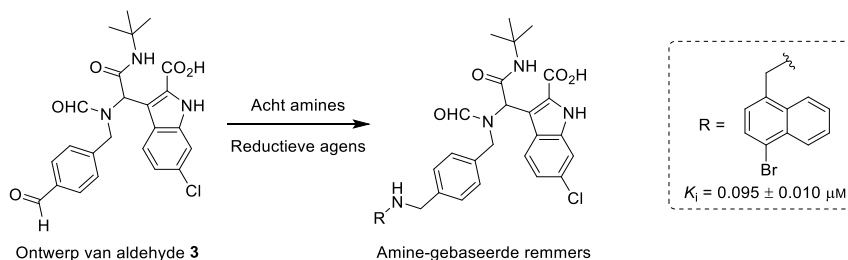
**Schema 1.** Links, formatie van *in situ* gevormde acylhydrazonen die getest worden op 15-LOX-1 en; rechts, de chemische structuur van de beste remmer (**17**).

Ondanks de sterke remming en LLE-waarden, hebben de indoolverbindingen last van lage wateroplosbaarheid. Daarom onderzoeken we in **Hoofdstuk 3** de mogelijkheden om het indooldeel te vervangen door middel van de methode die in Hoofdstuk 2 is ontwikkeld. Als startpunt wordt de staart van de voorheen gerapporteerde verbinding gebruikt als hydrazide en verschillende aromatische aldehydes ter vervanging van het indooldeel in het molecuul (Schema 2). Dit leidt tot de identificatie van de 3-pyridylring als een potentiële vervanger. Echter is het duidelijk dat, in vergelijking met de indoolmoleculen, de verbinding een stuk minder potent is ( $\text{IC}_{50} = 16 \pm 6 \mu\text{M}$ ). Pogingen om de 3-pyridyl ring te optimaliseren met verschillende elektrondonerende en elektronzuigende groepen zijn tevergeefs. Ook het vervangen van de hydrazide staart met hydrazides van de vier sterkste remmers uit Hoofdstuk 2 geven geen verbetering in de inhibitie van 15-LOX-1.



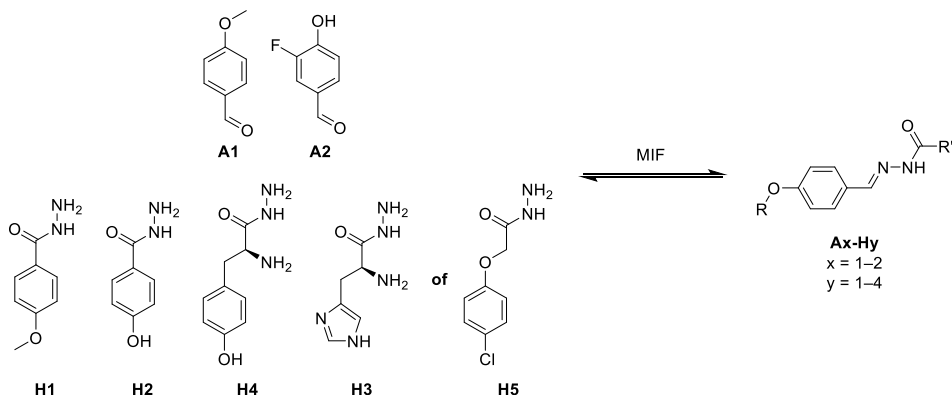
**Schema 2.** Links, formatie van *in situ* gevormde acylhydrazonen die getest worden op 15-LOX-1 om een vervanger te vinden van de indookern uit Hoofdstuk 2 en; rechts, de chemische structuur van de beste remmer.

In **Hoofdstuk 4** onderzoeken we de mogelijkheden van een eiwit-gerichte reductieve aminering om remmers te vinden voor het MDM2-eiwit. Na de ontdekking van het flexibele Leu26 gebied wilden we MDM2 gebruiken in een kinetisch doelwit-gerichte synthese (KDGS) strategie. Deze methode zou ideaal zijn om remmers te vinden die binden in het flexibele gedeelte, iets wat praktisch onmogelijk is op basis van alleen de eiwitstructuur. Gedeeltelijk gebaseerd op de kristalstructuur van MDM2 en een gerapporteerde remmer, maken we een nieuw ontwerp op basis van een reductieve amineringsreactie. Het aldehyde wordt eerst gemaakt en daarna gereageerd met verschillende amines in aanwezigheid van MDM2 en  $\text{NaCNBH}_3$ . Op basis van de detectielimiet van onze analytische methode, concluderen we dat de reactie niet plaatsvindt in de aanwezigheid van het eiwit. Na synthese van alle producten uit de bibliotheek en het testen van de remmers op MDM2 en MDMX, blijkt dat één van de producten erg sterk en relatief selectief MDM2 remt (Schema 3).



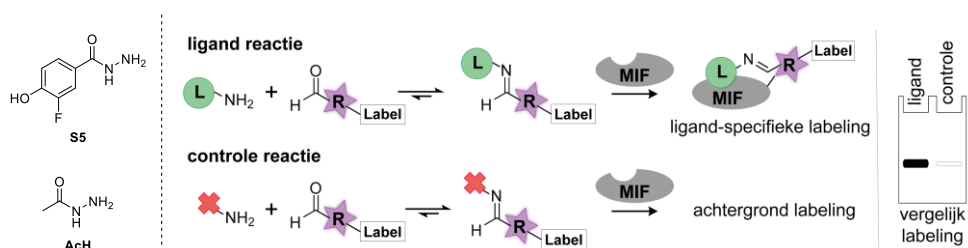
**Schema 3.** Links, synthese van reductieve amineringsproducten als remmers van MDM2, en; rechts, chemische structuur van de sterkste remmer.

**Hoofdstuk 5** beschrijft hoe we DCC toepassen om remmers te vinden van het MIF-enzym. We ontwerpen een kleine bibliotheek van acylhydrazonen met fenolderivaten om wel of geen interacties te hebben met Asn97 (Schema 4). Aanvankelijk gebruiken we **A1–2** en **H1–4**, maar **H3** bleek zelfs na het verhogen van de pH de acylhydrazoneformatie te katalyseren. Daarom vervangen we **H3** met **H5** en herhalen we de DCC-experimenten. Twee verbindingen lijken meer te worden gevormd in de aanwezigheid van MIF. Het controle-experiment met BSA-eiwit laat zien dat één van deze moleculen (**A1–H5**) daar ook aanzienlijk toeneemt. **A2–H5** laat daarentegen een kleine amplificatie zien in het controle-experiment, maar een grote toename met MIF. We synthetiseren daarom **A2–H5** en vinden dat dit inderdaad een remmer van MIF is ( $K_i = 5.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ). De andere verbindingen geven geen amplificatie in de DCC, terwijl dat bijvoorbeeld een van de potentiële producten wel degelijk een remmer van MIF is (**A2–H1**,  $K_i = 6.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ). We maken daarom een aantal extra verbindingen om een potentiële SAR te onderzoeken en komen erachter dat de positie en richting van de acylhydrazoneverbinding geen invloed heeft op de sterkte van de remming. Overeenstemmend met de literatuur vinden we dat **A1–H1** geen invloed heeft op de activiteit van MIF en dat de fluorsubstituent in **A2–H1** de remming ongeveer verviervoudigt. Een tweede *ortho*-fluorsubstituent verlaagt de remming echter met een factor twee. In vergelijking met de huidige remmers in de literatuur en in onze onderzoeksgroep zijn de acylhydrazone remmers een stuk minder sterk. Daarom denken we dat het erg moeilijk wordt om dit type remmer aanzienlijk te verbeteren.



**Schema 4.** Dynamisch combinatoriële bibliotheek voor het vormen van acylhydrazonen als remmers van MIF.

We realiseren ons vervolgens dat een fluor-gesubstitueerde fenol wellicht ook gebruikt kan worden om MIF te labelen in de door de Witte groep recentelijk gerapporteerde combinatoriële labelingsmethodologie (Schema 5). Door aldehydes met verschillende eiwit-modificerende groepen te combineren met hydrazide **S5**, vinden we tijdsafhankelijke labeling voor één van de *in situ* gevormde probes. Controle-experimenten bestaande uit het beschermen van de alcoholgroep, denaturatie voorafgaand aan de labeling en competitie met een bekende covalente MIF-remmer, tonen aan dat het zeer waarschijnlijk is dat de labeling plaatsvindt in het katalytische centrum van MIF.



**Schema 5.** Schematische illustratie van de combinatoriële labelingsmethodologie. Een fenol hydrazide (**L** / **S5**) wordt gereageerd met een eiwit-modificerende groep (R) bevattende aldehyde. Het aldehyde en de acylhydrazon probe dragen een label die gevisualiseerd kan worden door middel van een fluorofoor. Door de fluorescentie-intensiteit te vergelijken met een controleprobe kan specifieke labeling van een eiwit gedetecteerd worden. Aangepast overgenomen uit Van der Zouwen *et al.*; *Chem. Commun.* **2019**, 55, 2050.

## 7.2 Toekomstperspectief

Eiwit-gebaseerde DCC wordt nu iets meer dan twee decennia toegepast. Het concept van het genereren van een bibliotheek in de aanwezigheid van farmaceutisch relevante doelwitten, dat daarbij de selectieve vorming geeft van bindende remmers, is nog steeds fascinerend. Ondanks dat het concept een revolutie kan betekenen voor de ontdekking van medicijnen, moeten er nog vele hindernissen overwonnen worden. Allereerst moeten grotere en complexere bibliotheken worden toegepast, zodat de methode ook daadwerkelijk een voordeel heeft ten opzichte van traditionele synthese van ieder mogelijk product. Daarnaast zullen tijden om een evenwicht in te stellen, verkort moeten worden zodat ook minder stabiele enzymen gebruikt kunnen worden. De ontwikkeling van nieuwe reversibele DCC-reacties en het gebruik van aangepaste substraten die de vorming versnellen, zouden hierbij kunnen helpen. Ten slotte zou de ontwikkeling van op microflow gebaseerde DCC, waarvan recentelijk het eerste voorbeeld<sup>1</sup> is gepubliceerd, veel kunnen bijdragen aan de verdere ontwikkeling van het DCC-veld.

Een ander algemeen probleem van DCC is het stilleggen van de evenwichtsreactie voorafgaand aan de analyse. Elke handeling met het monster kan het evenwicht verstoren. Dit is een onderschat probleem, aangezien het onbekend is hoeveel het evenwicht daadwerkelijk verstoord wordt. In het ideale geval zou een bibliotheek rechtstreeks geanalyseerd kunnen worden, zonder toevoeging van base of oplosmiddelen, verhitting, filtratie of andere bewerkingen. Tot dusver is dit alleen mogelijk met speciale NMR-methoden, maar hierbij is de grootte van de bibliotheek erg beperkt. De toepassing van <sup>19</sup>F-NMR in de analyse van eiwit-gebaseerde DCC-reacties zou erg handig kunnen zijn. Ondanks de veelvuldige toepassing in de organische chemie en analyse van dynamische systemen, is er tot dusver maar één voorbeeld van analyse in eiwit-gebaseerde DCC met

<sup>19</sup>F-NMR.<sup>2</sup> Opmerkelijk genoeg is in dit voorbeeld gebruikgemaakt van een slechte remmer ( $IC_{50} = \pm 3$  mM) en zijn er alleen 1D-spectra gebruikt. Vele moleculen in Hoofdstuk 5 van deze thesis bevatten een fluoratoom en aangezien we al werkende remmers hebben, biedt dit een goed startpunt voor het verder ontwikkelen van DCC op basis van <sup>19</sup>F-NMR.

Met betrekking tot Hoofdstuk 5 zijn er nog meerdere openstaande vragen. Om uiteindelijk een vervanger voor de fenolen te vinden, zullen de DCC-condities eerst geoptimaliseerd moeten worden door middel van bibliotheken met daarin bekende remmers. De condities kunnen gevarieerd worden door het testen van verschillende pH's, katalysatoren, reactietijden en buffers. Indien er een werkende DCC-methode gevonden wordt, dan zullen fenolvervangers geprobeerd moeten worden om te kijken of het evenwicht verschuift door de additie van MIF.

Ten slotte willen we benadrukken dat het onderzocht moet worden hoe acylhydrazonen er daadwerkelijk uit zien in oplossing. Dit klinkt vanzelfsprekend, maar het is essentieel voor het gebruik in modellering en docking, evenals bij het ontwerpen van nieuwe remmers en mogelijke bioisosteren. Een gedetailleerde analyse met 2D-NMR spectroscopie toonde aan dat de verbindingen uit Hoofdstuk 2 in DMSO waarschijnlijk niet als *Z*-isomeer bestaan, maar enkel als *E*<sub>synperiplanar</sub> en *E*<sub>antiperiplanar</sub>. Dit effect is eerder beschreven in 2013.<sup>3</sup> Echter zijn er op basis van gesplitste pieken in NMR vele voorbeelden beschreven waarin *E*- en *Z*-isomeren worden besproken. Ook zijn er veel publicaties te vinden waarin geen enkele aandacht aan de conformatie wordt besteed. Om data van activiteitsassays goed te interpreteren, is het essentieel dat we begrijpen hoe acylhydrazonen er daadwerkelijk uit zien. Daarnaast weten we niet of er makkelijk rotatie om de N–N binding van een remmer plaats kan vinden om bijvoorbeeld meer interacties aan te gaan met een eiwit. Hetzelfde geldt voor rotatie om de amidebinding. Als er rotatie plaatsvindt, dan heeft dit grote consequenties voor de algehele structuur en vorm van het molecuul. Deze vragen zullen dan ook in toekomstig onderzoek door middel van bijvoorbeeld NMR-spectroscopie, röntgendiffractie en *in silico* methoden beantwoord moeten worden.

## 7.3 Referenties

- (1) Qiu, C.; Fang, Z.; Zhao, L.; He, W.; Yang, Z.; Liu, C.; Guo, K. *React. Chem. Eng.* **2019**, *4* (4), 658–662.
- (2) Ekström, A. G.; Wang, J. T.; Bella, J.; Campopiano, D. J. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (43), 8144–8149.
- (3) Lopes, A. B.; Miguez, E.; Kümmerle, A. E.; Rumjanek, V. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. *Molecules* **2013**, *18* (10), 11683–11704.