

# VU Research Portal

## High-resolution screening of metabolite-like lead libraries

Falck, D.

2013

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Falck, D. (2013). *High-resolution screening of metabolite-like lead libraries*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# **Chapter 6.2**

---

**Nederlandse samenvatting**

---

## Hoge-resolutie screening voor metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken

In dit proefschrift worden nieuwe applicaties van hoge-resolutie screening (HRS) onderzocht. Daarvoor streefden wij naar verbetering van bestaande systemen en verbreding van hun mogelijkheden. Hierbij hoorden geavanceerde integratie van chromatografie, massaspectrometrie, bioassays en in het bijzonder innovatieve synthetische methodes. Wij ontwikkelden nieuwe HRS systemen voor twee doelproteïnen, p38 $\alpha$  mitogen-geactiveerd proteïne kinase (p38 $\alpha$ ) en soluble epoxide hydrolase (sEH) [Hoofdstuk 2]. Verder bereikten wij een efficiënte en geïntegreerde aanpak voor het genereren en screenen van metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken, door integratie van vier complementaire modificatiemethodes met het p38 $\alpha$  HRS systeem, welke uiteindelijk resulteerden in structuur-affiniteitsrelaties [Hoofdstuk 3]. Wij analyseerden grondig de mogelijkheden en beperkingen van structuuropheldering van gerelateerde stoffen met behulp van vloeistofchromatografie–(ion-trap–time-of-flight) hoge-resolutie massaspectrometrie (LC–HR–MS<sup>n</sup>) in relatie met HRS gebaseerd op de metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken van de kinase remmers [Chapter 4.1]. Uiteindelijk waagden wij een poging om de (mogelijke) toekomst van HRS te exploreren. Deze zou mogelijk bestaan in integreren in het HRS systeem van geminiaturiseerde kernspinresonantie spectroscopie (NMR) voor verdere structuuropheldering [Hoofdstuk 4.2] en/of inductief-gekoppelde plasma MS (ICP-MS) voor absolute kwantificering [Hoofdstuk 5].

Het p38 $\alpha$  systeem is het eerste on-line post-column bioaffiniteitsassay systeem voor een enzym, een belangrijke stap in de ontwikkeling van HRS bioassays [Hoofdstuk 2.2]. Bij het sEH HRS systeem waren wij voornamelijk geïnteresseerd in het toegankelijk maken van de mogelijkheden van HRS in metabolismestudies voor dit doelenzym en hebben we daarom voor een klassieke benadering gekozen [Hoofdstuk 2.3].

In het p38 $\alpha$  HRS systeem hebben wij bovendien nieuwe oplossingen voor het screenen van zeer lipofiele stoffen geïntroduceerd. Het gebruik van fused-silica capillairen laat zien dat er nog steeds mogelijkheden zijn om de HRS bioassay technologie te verbeteren, zelfs in zo veelvuldig bestudeerde aspecten als post-kolom reactoren. In dit geval resulteerde de betere piekvorm in een betere chromatografische resolutie en nauwkeurigere verdunningsberekeningen. Wij bereikten uitstekende prestaties van zowel het p38 $\alpha$  als het sEH HRS systeem. Voor het p38 $\alpha$  HRS systeem blijkt dit uit uitstekende kengetallen zoals een Z'-factor van rond 0.8 en een signaal/ruis verhouding (S/N) van 100. Verder kwam de gemeten affiniteitsranking overeen met de literatuurwaarden. Helaas toonde de enige teststof waarvoor affiniteitsdata op niet-phosphoryleerde p38 $\alpha$  beschikbaar zijn (BIRB796) een buitengewoon langzaam kinetiek. Dat voorkwam een kwantitatieve vergelijking van de IC<sub>50</sub> waarden voor validatiedoeleinden omdat vanwege de beperkte incubatietijden in HRS het evenwicht niet bereikt werd. Toch kon de affiniteit van BIRB796 en die van andere representatieve stoffen van alle drie types van ATP-competitieve binding gemeten worden. Het sEH HRS systeem toonde een S/N van boven de 60 maar de kwaliteit zou veel beter zijn geweest als er modernere chromatografische apparaten waren gebruikt. Wij konden zeer betrouwbaar de affiniteit en de moleculestructuur combineren en daardoor zelfs isobare en vele isomere componenten onderscheiden. Dit was in beide HRS systemen realiseerbaar maar kon in het p38 $\alpha$  systeem [Hoofdstuk 2.2, Hoofdstuk 3] nog duidelijker worden aangetoond dan in het sEH systeem [Hoofdstuk 2.3]. De duidelijke voordelen van HRS ten opzichte van hoge-doorvoer screening (HTS) met betrekking tot het bioassay gedeelte worden onder ander duidelijk in de lagere p38 $\alpha$  concentratie en de vergelijkbare sEH concentratie ondanks de significant gereduceerde incubatietijd. De mogelijkheid om mengsels te analyseren is overduidelijk ook een belangrijke voordeel van HRS ten opzichte van HTS. Verder hebben wij voor beide systemen enzymstabiliteitgerelateerde problemen opgelost en een oplossing gevonden voor de substraatoplosbaarheidsproblemen die bij het sEH systeem speelden. Ook hebben wij bij het opzetten van en tijdens de HRS experimenten

[Hoofdstuk 2, Hoofdstuk 3] een aantal verstoringen gezien welke juist duidelijker zichtbaar waren in de HRS bioassays. Voorbeelden zijn de auto-fluorescentie en het peak tailing in het p38 $\alpha$  HRS bioassay, welke de IC<sub>50</sub> metingen verstoren [Hoofdstuk 2.2, Hoofdstuk 3.2], en gedeeltelijk de neerslagproblemen tijdens de ontwikkeling van het sEH HRS bioassay [Hoofdstuk 2.3]. De zichtbaarheid van de verstoringen zou als een nadeel aangemerkt kunnen worden, maar wij geven sterk de voorkeur aan het visualiseren en rekening houden met dit soort verstoringen boven het vertrouwen op onjuiste gegevens. Daarom zien wij het zichtbaar maken van verstoringen door het HRS systeem als een van zijn grote voordelen. Een andere belangrijke ontwikkelingsstap is de integratie in HRS systemen van methoden voor de synthese van metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken, waarmee we zowel de synthese als de analyse van structuur en affiniteit in één aanpak of zelfs in een geheel geïntegreerd systeem realiseren. Dit resulteerde in een efficiëntere bestudering van de chemische ruimte rond een substraat-kernstructuur, met als eindpunt een structuur-affiniteitsrelatie met niet meer dan het substraat als inbreng. De substraten waren belangrijke p38 $\alpha$  remmers, waaronder een lead-verbinding (DMPIP), een veelgebruikte moleculaire sonde (SB203580) en klinische kandidaat moleculen (BIRB796 en TAK-715). Omdat wij gefocuseerd waren op metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken, hebben wij ook uitgezocht of de synthesesystemen geschikt waren als productiestrategieën voor daadwerkelijke metabolieten. Daarom hebben wij ook *in vitro* metabolisme met behulp van humane lever mikrosomen (HLM) in de methodenvergelijking opgenomen.

Het elektrochemische omzetting (EC) HRS systeem was analytisch gezien zeker de meest interessante geïntegreerde synthese-aanpak [Hoofdstuk 3.1]. Het EC apparaat was al succesvol ingezet bij EC-MS en EC-LC-MS systemen en vereiste geen intermediaire monsterbewerkingsstappen. Daardoor kon een volledig geïntegreerde EC-LC-p38 $\alpha$  binding/MS systeem worden opgezet. Dit bleek bijzonder nuttig bij de detectie van reactieve EC producten [Hoofdstuk 3.1] welke (deels) ook later in de HLM incubaties teruggevonden worden [Hoofdstuk 3.3].

Het gebruik van biokatalyse voor het genereren van metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken bleek ook heel succesvol te zijn. De gebruikte bibliotheek van Cytochrome P450 BM3 (BM3) mutanten produceerde een aantal omzettingen producten. Deze producten toonden verhoogde hydrofiliciteit en één ervan behield zelfs de volle p38 $\alpha$  affiniteit [Hoofdstuk 3.2]. Omdat grote delen van de BM3 bibliotheek 'gehumaniseerd' waren, was er een significante overlap met producten van de HLM incubaties. Het feit dat wij door schaalvergroting en opzuivering ook IC<sub>50</sub> waardes konden bepalen en NMR metingen konden uitvoeren heeft de informatiediepte duidelijk verhoogd. Verder hebben wij daardoor kunnen aantonen hoe de aanvankelijke resultaten van het HRS systeem kunnen worden gebruikt om verdere structuuropheldering en farmacologisch onderzoek van veelbelovende omzettingen producten te sturen.

Vervolgens vergeleken wij de EC en de biokatalytische aanpak met chemisch (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of fotochemisch (zichtbaar licht) induceerde omzettingen [Hoofdstuk 3.3]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleek zeer goed in staat om veel verschillende en meer hydrofiele producten te maken, bijvoorbeeld een grote aantal geoxydeerde isomeren. Fotochemische omzetting resulteerde in enige unieke producten en induceerde isomerie in de kernstructuur, wat mogelijk tot nieuwe farmacoforen zou kunnen leiden. Een consequentie van isomerie is het wat beperktere succes in MS structuuropheldering [Hoofdstuk 4.1].

Iedere gebruikte synthesesmethode heeft haar eigen profiel van sterke punten en beperkingen. Biokatalyse en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zijn bijvoorbeeld het meest succesvol in het verhogen van hydrofiliciteit. Terwijl biokatalyse de meest arbeidsintensieve methode is, maar ook de meest selectieve, is H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeer eenvoudig te gebruiken, maar produceert het vaak ook de meeste (isomere) producten. Fotochemie en EC hebben geen voorkeur voor hogere hydrofiliciteit in de producten, maar fotochemie levert de meeste unieke producten. Aan de andere kant is het EC-HRS systeem vanwege zijn directe analyse mogelijkheden zeer krachtig voor de analyse van reactieve producten.

Wij concluderen dat alle omzettingmethoden zeer complementair zijn en dus samen een

interessante verzameling vormen voor het genereren van metaboliet-gerelateerde lead-bibliotheken. Zo waren wij in staat om de meerwaarde van de integratie van de synthese van mengsels met het HRS strategie te demonstreren. Het p38 $\alpha$  systeem leverde in korte tijd een initiële structuur-affiniteitsrelatie voor de lead-bibliotheken op en kan als een solide startpunt voor verder farmacologisch en toxicologisch onderzoek gezien worden.

Naast het produceren van lead-bibliotheken met gunstige eigenschappen hebben, misschien niet onverwacht, vooral de biokatalytische en de chemische aanpak potentieel voor de synthese van metabolietstandaarden getoond. De innovatie ligt hierbij vooral in de mogelijkheid om zich voor gedetailleerd onderzoek op actieve metabolieten te focuseren en toch tegelijkertijd een breder overzicht te verwerven.

Omdat het een integraal bestanddeel van het HRS systeem is, hebben wij in meer detail naar mogelijkheden en beperkingen van structuuropheldering met behulp van LC–HR-MS<sup>n</sup> gekeken, zoals die in de bijzondere omstandigheden van een (HRS) screeningsomgeving optreden [Hoofdstuk 4.1]. De bijhorende beperkingen omvatten het gebruik van 'generieke' parameters voor ionisatie- en fragmentatie-experimenten en verhinderen van ingewikkelde MS experimenten zoals stabiele-isotooplabeleling en H/D-uitwisseling. Niettemin was het relateren van modificatieposities naar specifieke delen van de moleculen vaak succesvol en kon in speciale gevallen zelfs de absolute structuur opgehelderd worden, bijvoorbeeld voor CP472, een omzettingproduct van DMPIP in de EC experimenten [Hoofdstuk 3.1].

De soms drastische veranderingen in fragmentatie als gevolg van relatief kleine modificaties en onverwachte intra-moleculaire omleggingen waren uitdagingen in de LC–HR-MS<sup>n</sup> structuuropheldering. Deze omleggingen waren tegelijkertijd interessante voorbeelden van gasfase-chemie, bijvoorbeeld de electrocyclische omlegging in de fragmentatie van TAK-715, de omlegging voorgaande aan de vorming van CP305 (of zijn fragmentatie) uit SB203580, de hydride-omlegging met als gevolg watereliminatie vanuit de aromatische hydroxymethyl groep in CP416A (afkomstig van TAK-715), en de omlegging van de hele *para*-fluoro-benzyl groep in DMPIP. Bovendien detecteerden wij een onverwacht groot aantal homolytische breukreacties welke in strijd zijn met de even-elektron regel. Daarbij hebben wij, door gebruik te maken van de ion-trap fragmentatie in combinatie met time-of-flight HR-MS detectie, het belang van een heldere relatie tussen precursor ion en product ionen voor structuuropheldering aangetoond [Hoofdstuk 4.1].

Naast de HR-MS<sup>n</sup> structuuropheldering verkenden wij een veelbelovende mogelijkheid om in de toekomst structuuropheldering met behulp van NMR te integreren met het HRS systeem [Hoofdstuk 4.2]. Hierbij stonden de reactieve producten van BIRB796 centraal die in het EC–HRS systeem ontdekt werden [Hoofdstuk 3.1]. Hun structuur wilden wij met behulp van NMR ophelderen. De logische aanpak gericht op integratie met HRS zou een miniaturiseerde flow-sonde NMR kunnen zijn, waarmee de kleine monstervolumes en een doorstroom-EC-apparaat goed te combineren zijn. Uiteindelijk gebruikten wij een vergrote werkelektrode en een vaste-fase extractie (SPE) stap ten behoeve van voorconcentratie en oplosmiddeluitwisseling in combinatie met een stripline-NMR chip sonde en een 600 MHz NMR instrument. Het systeem was goed geschikt om de BIRB796 standaard te detecteren. De oplosmiddeluitwisseling was efficiënt genoeg om een vergelijking van EC–SPE–stripline-NMR resultaten en conventioneel (2D-)<sup>1</sup>H-NMR mogelijk te maken. Helaas was de omzettingsgraad van BIRB796 naar zijn twee reactieve producten in de on-line experimenten duidelijk lager dan in de off-line experimenten. Daardoor was productidentificatie alleen mogelijk door het vergelijken met de conventionele <sup>1</sup>H-NMR spectra in plaats van door de bedoelde onafhankelijke structuuropheldering. Toch liet het systeem veelbelovende resultaten zien en zijn er ook vele mogelijkheden om de bestaande gevoeligheid te verbeteren en zo een directe integratie met het HRS systeem te bereiken.

Een grote stap voorwaarts in HRS zou de mogelijkheid zijn om absolute kwantificering van gemeten componenten in een HRS systeem te integreren. Dan zou bijvoorbeeld een kwantitatieve structuur-affiniteitsrelatie (QSAR) gemaakt kunnen worden direct op basis van het mengsel gesynthetiseerd met de beschreven omzettingmethoden. ICP-MS biedt zich hiervoor aan omdat het heel gevoelig kan zijn en zijn respons vrijwel volledig onafhan-

kelijk is van de chemische omgeving van een atoomkern, vanwege de constant atomaire ionisatie en de grote verschillen tussen moleculaire bindingsenergie en atomaire ionisatie-efficiëntie. Helaas kunnen de hoofdbestanddelen van organische moleculen (waterstof, koolstof, zuurstof en stikstof) om verschillende redenen niet met LC–ICP-MS worden gemeten. Maar veel medicijnen bevatten halogeen- en/of zwavelatomen en er zijn zelfs voorbeelden welke metaalaten bevatten. Broom en jodium konden zeer gevoelig met ICP-MS worden gemeten, maar dat was niet het geval bij zwavel en chloor [Hoofdstuk 5]. De waargenomen isobare polyatomaire verstoringen zouden met reactie/botsingscellen of ICP-HR-MS instrumenten kunnen worden voorkomen. Daardoor zou gevoelige kwantificering van zwavel en/of chloor bevattende verbindingen mogelijk kunnen worden. Tot nu toe waren de detectielimieten op het lage-resolutie ICP-MS 30 respectievelijk 200 keer te laag om een met HRS verenigbare kwantificering te leveren [Hoofdstuk 5]. ICP-MS is gebaseerd op een gelijkmatige stroom van oplosmiddel en is daarom niet geschikt om met klassieke oplosmiddelgradiënten gecombineerd te worden. Hoge-temperatuur LC (HTLC) biedt een elegante mogelijkheid om een efficiënte scheiding bij constante oplosmiddelsamenstelling te realiseren [Hoofdstuk 5]. Daarbij is HTLC niet alleen in verband met ICP-MS interessant, maar het kan ook een oplossing zijn om de invloed van de oplosmiddelgradiënt in een post-kolom bioassay te beperken. Ook hebben lage organische oplosmiddelconcentraties een negatieve invloed op de ESI-MS respons, maar maakt de hoge gevoeligheid van ESI-MS toch meestal een aantrekkelijk compromis mogelijk.