

VU Research Portal

Integrated Analytical Strategies for Drug Discovery

de Vlieger, J.S.B.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

de Vlieger, J. S. B. (2011). *Integrated Analytical Strategies for Drug Discovery*.

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

Chapter 9-NL

Samenvatting, Conclusies en Perspectieven

Samenvatting, conclusies en perspectieven.

Het onderzoek en de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een complex en tijdrovend proces waarbij meerdere (sub)disciplines van wetenschap betrokken zijn. Analytische chemie is, en zal altijd als één van de belangrijkste vakgebieden betrokken zijn gedurende het hele proces. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling en toepassing beschreven van innovatieve analytische technologieën voor onderzoek en ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. **Deel I** beschrijft de ontwikkeling en toepassing van analytisch chemische technieken voor de studie naar geneesmiddelmetabolisme. Door de publicatie van de “Metabolites in Safety Testing (MIST)” richtlijnen van de US Food and Drug Administration is de ontwikkeling en implementatie van nieuwe analytische technologieën in dit gebied significant toegenomen. De belangrijkste vragen die beantwoord moeten worden in studies naar geneesmiddelmetabolisme zijn: Wat is de chemische structuur van de metabolieten en in welke hoeveelheid worden deze gemaakt? Hoewel dit relatief makkelijke vragen lijken, vereist het beantwoorden van deze vragen state-of-the-art analytisch-chemisch en synthetisch-chemische benaderingen. Er zijn behoorlijk wat uitdagingen in dit vakgebied, zoals de kwantificering van geneesmiddelmetabolieten zonder referentie standaarden, volledige structuuropheldering van lage concentraties van metabolieten en de biologische activiteitsbepaling van de gevormde metabolieten. Het werk beschreven in dit proefschrift behandelt en evalueert verscheidene van deze uitdagingen.

Vorming van farmaceutisch relevante moleculen

De in dit proefschrift beschreven metabolieten en andere farmaceutisch relevante moleculen zijn op verschillende wijzen gevormd. Het gebruik van conventionele *in vitro* incubatie systemen met behulp van rat en humane lever microsomen (RLM en HLM) alsook het gebruik van een set van geneesmiddel metaboliserende mutanten van cytochroom P450 BM3 is beschreven. **Hoofdstukken 2-5** beschrijven het gebruik van deze enzymssystemen voor verschillende doeleinden. In de **Hoofdstukken 2-4** werden deze gebruikt voor de productie van humaan relevante metabolieten van kinase remmers, steroïden en de antibacteriële stof trimethoprim. Het additionele gebruik van deze biosynthetische enzymssystemen in **Hoofdstuk 5** zorgde voor de formatie van een gerichte stoffenbibliotheek voor het bepalen van de interactie met de estrogene receptoren hER α en hER β . In de 210

Hoofdstukken 2 en 7 is elektrochemische oxidatie en reductie beschreven voor het vormen van geneesmiddel-gerelateerde stoffen. Hoewel elektrochemie vaak toegepast wordt voor het maken van referentiestoffen om metaboliëtidificatie te vergemakkelijken, is een directe vergelijking met humaan relevante metaboliëten niet uitgevoerd in dit proefschrift, mede omdat een dergelijk gebruik van elektrochemie buiten de doelstellingen valt van het huidige werk. Het vergelijken van elektrochemische oxidatieproducten met bijvoorbeeld microsomale incubaties moet altijd zeer zorgvuldig worden gedaan. Elektrochemie kan namelijk nooit de stereoselectiviteit en de katalytische eigenschappen van enzymen vervangen.

Een andere benadering voor het vormen van farmaceutisch relevante moleculen is beschreven in **Hoofdstuk 8**. In een zogenaamde één-pots reactie is een complex mengsel gemaakt van 6 regio-isomeren van het *N*-gealkyleerde antibioticum neomycine. Vervolgens zijn van deze regio-isomeren de structuren bepaald en zijn ze gebruikt om de antibacteriële effecten hiervan te bepalen in een at-line microfractioneringsbenadering.

Strategieën voor identificatie en kwantificering

De belangrijkste techniek die gebruikt is in dit proefschrift voor de identificatie van producten is electrosprayionisatie hoge resolutie massaspectrometrie (ESI-HR-MSⁿ), vaak gekoppeld aan vloeistofchromatografie. Metaboliëtidificatie is uitgevoerd op verschillende manieren in de **Hoofdstukken 2-5**. In **Hoofdstuk 2** is de kwantificering van metaboliëten zonder het gebruik van gesynthetiseerde standaarden bereikt door hoge temperatuur vloeistofchromatografie (HTLC) te koppelen aan inductieve coupled plasma-massaspectrometrie (ICP-MS). Het gebruik van ICP-MS maakt het mogelijk om metaboliëten en geneesmiddelen te kwantificeren op basis van enkele zogenoemde marker-atomen. Behalve de platinum bevattende oncolytica kunnen geneesmiddelen en metaboliëten hiervan ook gekwantificeerd worden op basis van zwavel, jood, chloor en/of broom. De koppeling met een scheidingsmethode kan effect hebben op de detectorresponse, in het bijzonder wanneer er koppeling plaatsvindt met gradient LC methoden. Bij ICP-MS, ELSD, ESI-MS en veel andere detectie technieken kan het detectorsignaal sterk beïnvloed worden door veranderingen in de vloeistofsamenstelling van de mobiele fase. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot over- of onderschatting van de concentratie van de analyten aanwezig in het mengsel.

In dit proefschrift is dit onderwerp behandeld door een isocratische HTLC methode te ontwikkelen welke gecombineerd is met temperatuurgradiënten tot 200 °C om zo ICP-MS detectie mogelijk te maken. De specificiteit voor bepaalde elementen en het grote lineaire bereik van de ICP-MS bleken waardevolle eigenschappen te zijn die complementair te gebruiken zijn aan bijvoorbeeld ESI-MS. Recente ontwikkelingen in ICP-MS technologie bevatten o.a. de implementatie van hoge resolutie MS analysatoren. Dit kan het toepassingsgebied van deze waardevolle technologie binnen het geneesmiddelenonderzoek vergroten.

Hoofdstukken 3 en 4 beschrijven voorbeelden van metabolietidentificatiestudies. Met behulp van *in silico* metabolietvoorspelling, hoge resolutie massaspectrometrie en het gebruik van meerdere enzymatische systemen voor de productie van metabolieten is een veel omvattende dataset verkregen over het metabolisme van trimethoprim. In beide hoofdstukken werden verschillen waargenomen tussen incubaties met humane en rat levermicrosomen. Bovendien bleek de geneesmiddelmetaboliserende mutant van P450 BM3 bruikbaar te zijn om humaan relevante (reactieve) metabolieten te produceren. Uitdagingen in het metabolieten onderzoek zijn bijvoorbeeld de detectie van lage concentraties van metabolieten en de karakterisering van alle gevormde reactieve metabolieten. De recente ontwikkelingen van nieuwe strategieën, zoals Br-gelabelde glutathione om hoge resolutie isotoop filtering mogelijk te maken, dragen significant bij aan de volledige karakterisering van alle gevormde metabolieten. Het gebruik van specifiek gelabeld glutathion zou ook de detectielimieten voor ICP-MS kunnen verlagen en daarmee zowel nieuwe manieren voor kwantificering en profilering kunnen brengen.

De beperkingen van massaspectrometrie op het gebied van structuuropheldering van metabolieten werden ondervonden in **Hoofdstuk 5**. Steroïde structuren werden gemetaboliseerd door verschillende enzymatische systemen en vervolgens geanalyseerd met LC-ESI-HR-MS. De ESI-MS polariteit werd snel gealterneerd om zowel positieve als negatieve ESI-MS data te verkrijgen van de metabolieten. Dit was essentieel voor de detectie van deze steroïde structuren omdat de modificatie van de basisstructuur zowel de ionisatie-eigenschappen als het UV-absorptieprofiel significant beïnvloedde. Hoewel HR-MS data van alle metabolieten verkregen werd, kon de exacte positie van de modificatie niet bepaald worden op een effectieve manier. NMR studies werden uitgevoerd om de

metabolietstructuren op te helderen. Dit resulteerde niet alleen in de identificatie van de modificatie, maar leverde ook informatie over de regioselectiviteit van de metabole reacties. Norethisterone werd hoofdzakelijk gehydroxyleerd op de C15 en C16 positie in een β oriëntatie. Interessant genoeg, vertoonde de 16 β -OH metaboliet selectieve bindingseigenschappen naar hER α ten opzichte van hER β . Het tweede-orde metabolisme van deze stof was o.a. de aromatisering van de steroïde A ring naar 16 β -OH ethinylestradiol en had een zeer positief effect op de bindingsaffiniteit voor de receptor. Deze metaboliet was niet eerder beschreven en is in deze studie geïdentificeerd in incubaties met zowel de BM3 mutanten als humane levermicrosomen.

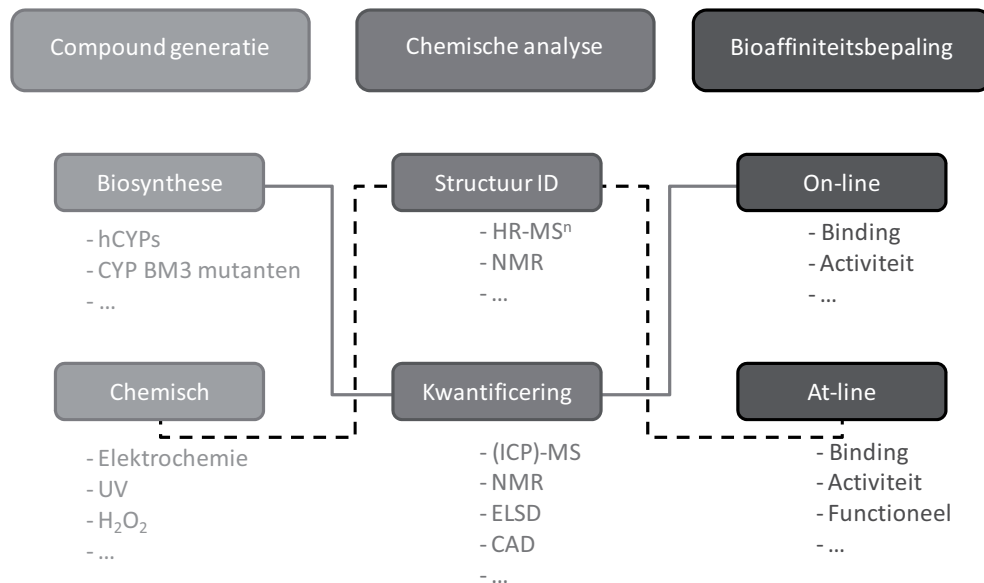
In **Hoofdstuk 8** maakte ESI-HR-MSⁿ de identificatie van 6 regio-isomeren mogelijk van *N*-gealkyleerde neomycinederivaten. Nadat LC-scheiding van dit complexe mengsel was uitgevoerd werden HR-MSⁿ-experimenten gedaan. Hoewel de MS en MS² spectra identiek waren voor alle zes regio-isomeren, werden er verschillen waargenomen in de MS³ en MS⁴ spectra. De fragmentatiepatronen van de glycosidebindingen in de basisstructuur van de derivaten maakten het mogelijk om de plaats van modificatie aan te duiden in ringen 1 en 4. De exacte plaats van modificatie in ring 2 van neomycine was niet mogelijk omdat deze fragmentatiereactie symmetrische fragmenten produceerde.

Zoeken naar biologische activiteit

Deel II van dit proefschrift behandelt de implementatie van biologische interacties in een analytisch-chemische omgeving. De multidimensionale screeningsmethoden zoals beschreven in de **Hoofdstukken 5-8** voegen daadwerkelijk waardevolle informatie toe aan de meer conventionele chemische analysemethoden. In een snelle en efficiënte manier werd er data verkregen over zowel de structuur als de biologische activiteit van de metabolieten, syntheseproducten, elektrochemische oxidatieproducten. Een belangrijk aspect van dit concept is de integratie van scheidingsmethoden en bioaffiniteitsbepaling. Dit maakt het mogelijk om relatief complexe mengsels te screenen zoals metabole incubaties, ongezuiverde syntheseproducten of bijvoorbeeld natuurextracten. In dit proefschrift zijn twee verschillende typen assays gebruikt voor drie verschillende target-eiwitten. **Hoofdstuk 5** beschrijft het gebruik van nucleaire receptoren, in het bijzonder de humane estrogeenreceptor α en β subtypes in een on-line bindingsassay. De binding werd bepaald door het detecteren van de

fluorescentietoename van een tracer-receptor complex. Dezelfde benadering is ook beschreven voor de mitogen-activated proteinkinase p38 α in **Hoofdstuk 6**, waarin de ontwikkeling van een nieuwe assay is beschreven waarbij aandacht besteed is aan de verbetering van signaal-ruis verhoudingen. Het voordeel van het gebruik van on-line bindingsassays is dat de interactie tussen het target-eiwit en het ligand relatief snel is. Hierdoor kan de detectie van deze interactie in dezelfde tijdschaal worden uitgevoerd als die van de scheidingsmethode en MS-detectie van de liganden. In **hoofdstuk 7** is de beschreven assay toegepast in een strategie voor on-line productie, identificatie en biologische karakterisering van kinaseremmers. Het alternatief voor een bindingsassay zou een on-line activiteitsassay zijn waarbij productvorming door het actieve enzym gedetecteerd moet worden. Hoewel dit soort assays beschreven zijn voor verschillende enzymen, vergroot het de complexiteit van deze assays behoorlijk. Ook heeft het invloed op de robuustheid van het totale systeem gebruikt voor dit soort assays. In **hoofdstuk 8** is met behulp van een at-line benadering op een totaal andere tijdschaal de antibacteriële activiteit bepaald van verschillende neomycinederivaten. Na scheiding van de derivaten en de toevoeging van alle benodigde reagentia voor de biologische assay werd er microfractionering in een 384-microtiterplaat uitgevoerd. Op deze wijze werd de on-line aanpak aangepast om het gebruik van conventionele plate-reader assays mogelijk te maken. Hierdoor kunnen ook relatief lange incubatie tijden gebruikt worden die bijvoorbeeld nodig zijn om antibacteriële effecten te observeren. Deze aanpak vergroot het toepassingsgebied van hyphenated screeningassays omdat de belangrijkste limitatie tot nu toe vooral de incubatie tijd was. De volgende innovaties in dit gebied zouden in elk geval de ontwikkeling van functionele assays tegen complexere target eiwitten zoals membraan gebonden receptoren (GPCRs) en ionkanalen moeten bevatten.

De ontwikkeling van de in elk hoofdstuk afzonderlijk beschreven hulpmiddelen draagt bij aan een complete set met modules die onderzoekers kunnen toepassen in het geneesmiddelenonderzoek. Figuur 1 geeft een overzicht van de technologieën ontwikkeld in dit proefschrift, eerder door anderen ontwikkeld, of technologieën die mogelijksterwijs in de nabije toekomst ontwikkeld worden.



Figuur 1: Modulaire benaderingen voor de integratie van productie, chemische analyse en bioaffiniteitsbepaling van nieuwe stoffen voor geneesmiddel onderzoek.

Idealiter leidt dit concept tot een modulaire benadering waarbij de verschillende technologieën aan elkaar gekoppeld kunnen worden. De twee lijnen zijn als voorbeeld in het figuur getekend. Verscheidene van deze koppelingen zijn beschreven in dit proefschrift. Toch blijft één van de belangrijkste toekomstige innovaties de kwantificering van de bioaffiniteit in bovenstaande assays. Dit zal uiteindelijk leiden tot de kwantitatieve affiniteitsbepalingen van bijvoorbeeld metabolieten in mengsels zonder de beschikbaarheid van referentiemetabolieten. De eerste stappen in dit proces zijn al ondernomen in **Hoofdstuk 2** waarin de metabolieten van kinaseremmers werden gekwantificeerd zonder referentiestandaarden. De integratie van bijvoorbeeld de kinaseaffiniteitsassays zoals ontwikkeld in **hoofdstuk 6**, met de ICP-MS gebaseerde kwantificering zou uiteindelijk kwantitatieve data moeten kunnen leveren van nieuw gevormde stoffen zoals metabolieten of ruwe syntheseproducten.

De impact en innovatie van nieuwe analytische technologieën voor het geneesmiddelenonderzoek hangt in een belangrijke mate af van de interactie tussen

de verschillende betrokken wetenschappelijke disciplines. Multidisciplinaire onderzoeksprojecten vereisen daadwerkelijk input van de verschillende subdisciplines over de specifieke uitdagingen in dat vakgebied. Het is juist in dit soort projecten waar analytische strategieën een significante bijdrage kunnen leveren aan de efficiëntie en aan de kwaliteit van zowel het geneesmiddelenonderzoek als de uiteindelijke ontwikkeling van het geneesmiddel.