

Diss. ETH No. 30310

Cannabinoid Receptor 2 in the Spotlight: Ligand-Directed Covalent Probes and Rational Tailoring of Ligand Functionality

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MIROSLAV KOSAR

Master of Chemistry with Honours, University of Edinburgh
born 06.09.1994

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner

Prof. Dr. James A. Frank, co-examiner

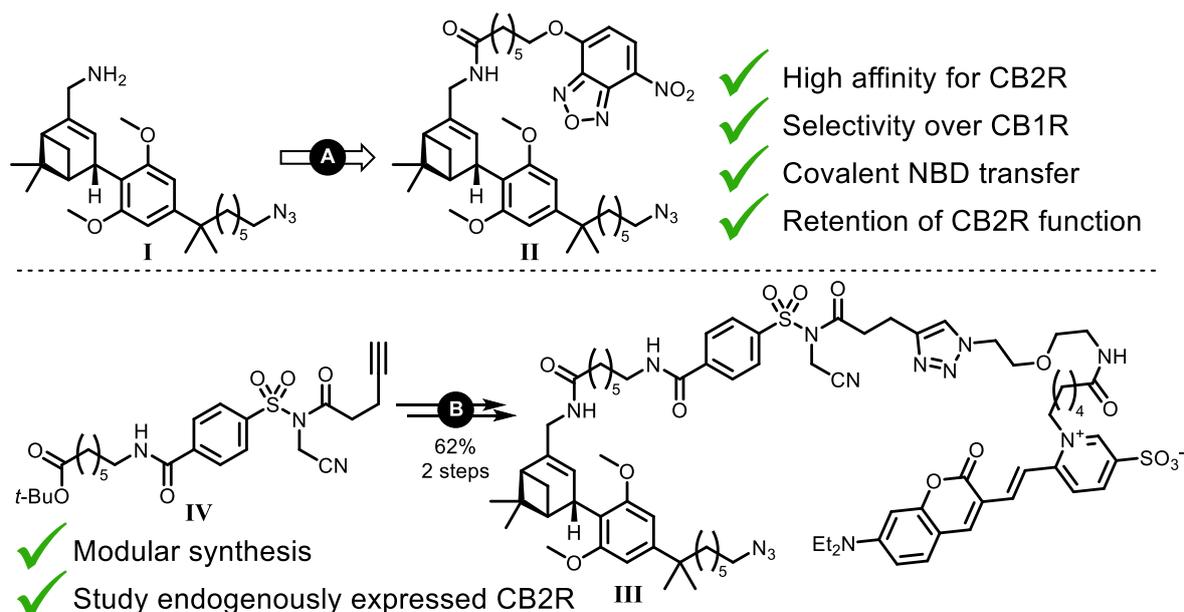
Dr. Uwe Grether, co-examiner

2024

Abstract

The endocannabinoid system (ECS) is a key signaling network found across all vertebrates. Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) and 2 (CB2R) represent two prominent G protein-coupled receptors (GPCR) that are integral to its functionality. Therapeutic modulation of CB1R and CB2R holds promise to address a diverse spectrum of conditions spanning from pain management to the treatment of immunomodulatory, metabolic, and central nervous system disorders. Yet, realization of this therapeutic potential has been hampered by insufficient understanding of the individual components of the ECS and the dynamic, intricate interactions between them. The work described herein capitalizes on the synergy between synthetic and computational chemistry, pharmacology, as well as structural and cellular biology to unravel the interplay between individual components of the ECS. The interdisciplinary collaborations supported design, synthesis, and application of novel chemical tools, which were used to elucidate receptor activation and to study endogenously expressed CB2R.

Chapter I describes the development of the first ligand-directed covalent (LDC) labeling toolkit to study CB2R (Scheme I). LDC chemistry delivers a fluorescent reporter, enabling the study of CB2R while retaining its ability to bind other ligands at the orthosteric site. A proof-of-concept study commenced with the *in silico*-guided introduction of *O*-nitrobenzoxadiazole (*O*-NBD) to a high affinity ligand **I** that yielded fluorogenic probe **II**. Probe **II** demonstrated covalent transfer of its NBD cargo to CB2R lysine residues in proximity of the orthosteric binding site. Promising results with **II** inspired incorporation of advanced electrophiles and fluorophores for application in a cellular setting. Novel synthetic strategies were devised to access probe **III**, using platform reagent **IV**, which allows incorporation of non-commercial cargos (DY-480XL) and ligands (**I**) in only two steps. Probe **III** achieved complete covalent CB2R labeling and specifically visualized CB2R in endogenously expressing microglial cells.



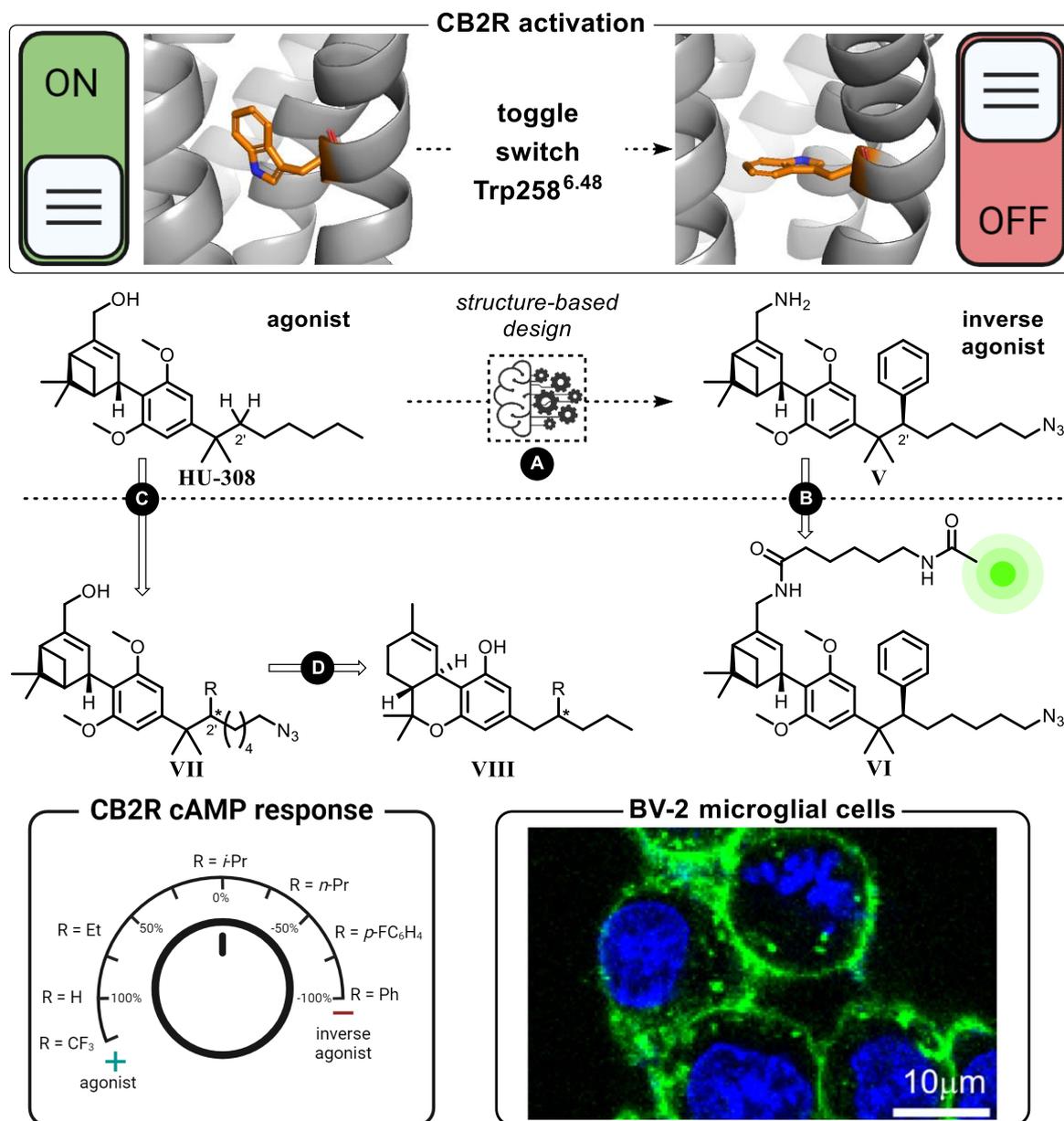
Scheme I. (A) Elaboration of privileged CB2R ligand **I** to the ligand-directed covalent *O*-NBD probe **II**. (B) Application of the *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide platform reagent **IV** to access fluorophore **III**.

The overwhelming majority of CB2R pharmacological tools are agonists that target the active receptor population, while CB2R-selective inverse agonists are scarce. This inequity inspired a campaign toward a versatile CB2R-selective inverse agonist. Phenyl substituent was introduced at C(2') of agonist **HU-308**, impeding the upward movement of Trp258^{6,48}; the single residue toggle switch of CB2R activation (Scheme II). *In silico* studies guided design of **V** that demonstrates excellent affinity for CB2R.

Upon derivatization of **V** with a wide range of substituents and fluorophores, the probes retain their high CB2R affinity, selectivity over CB1R, and inverse agonist functional profile. The probes behaved as inverse agonists with respect to cAMP inhibition and G protein recruitment at CB2R and did not stimulate β -arrestin–receptor association. Additionally, no CB2R activation was detected in live cell Ca^{2+} -release and ERK_{1/2} phosphorylation assays. Fluorophore **VI**, functionalized with Alexa488, enabled visualization of CB2R expressed at endogenous levels in BV-2 microglial cells using confocal microscopy.

A fine-tuned functional response could be achieved, which lie in between the agonist and inverse agonist extremes, by a judicious choice of substituents

introduced to C(2'). Accordingly, a ligand set featuring **VII** allows to achieve a fine-tuned CB2R functional response, including agonists, neutral antagonists, and inverse agonists. Exploration of pharmacophores beyond HU-308 yielded Δ^9 -THC based dual CB2R inverse agonist/CB1R antagonist **VIII**.



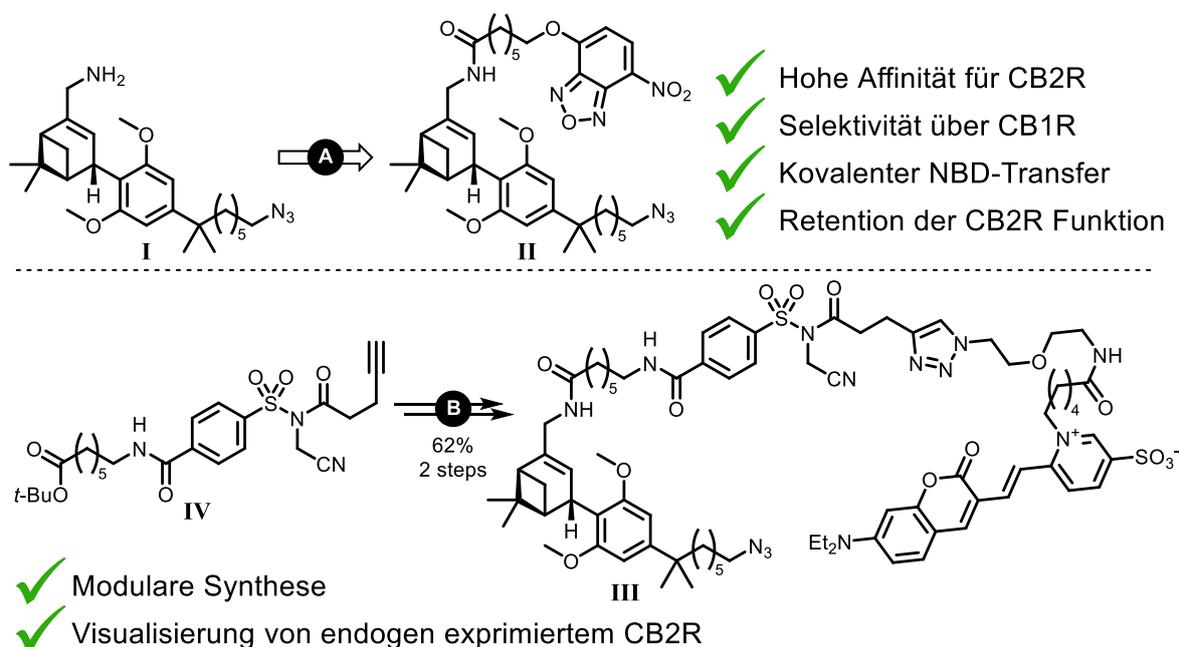
Scheme II. Structure-guided transformations of agonist **HU-308**; (A) to inverse agonist **V** by introduction of a C(2') phenyl substituent that was conjugated to fluorophores (B) to yield **VI**. (C) A set of C(2') substituted HU-308 ligands **VII** that allows to access tailored CB2R functional response in between the full agonist–full inverse agonist extremes. (D) Extension to pharmacophores beyond HU-308 yielded Δ^9 -THC-based dual CB2R inverse agonist/CB1R antagonist **VIII**.

Zusammenfassung

Das Endocannabinoid-System (ECS) ist ein Signalnetzwerk mit Schlüsselrolle, das bei allen Wirbeltieren zu finden ist. Die Cannabinoid-Rezeptoren Typ 1 (CB1R) und 2 (CB2R) repräsentieren zwei prominente G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die ein integraler Bestandteil des ECS sind. Die therapeutische Modulation des CB1Rs und des CB2Rs ist ein vielversprechender Ansatz um ein breites Spektrum an Erkrankungen von Schmerztherapie bis zur Behandlung von immunmodulatorischen-, metabolischen- und zentralen Nervensystem-Erkrankungen anzugehen. Die Realisierung dieses therapeutischen Potenzials wird jedoch durch ein unzureichendes Verständnis der einzelnen Komponenten des ECS und deren dynamisch-komplexen Wechselwirkungen. Die nachfolgende Arbeit nutzt die Synergie zwischen synthetischer und computergestützter Chemie, Pharmakologie sowie struktureller und zellulärer Biologie, um die komplexe regulatorischen Zusammenhänge innerhalb des ECS zu entwirren. Dabei unterstützt eine interdisziplinären Kooperationen Design, Synthese und die Anwendung neuartiger chemischer Werkzeuge. Diese wurden verwendet um Komponenten der Rezeptoraktivierung aufzuklären und um endogen exprimierten CB2R zu untersuchen.

Kapitel I beschreibt die Entwicklung des ersten ligandengesteuerten kovalenten (LDC) Markierungswerkzeugs zur Untersuchung des CB2Rs (Schema I). Die LDC-Chemie markiert den Rezeptor mit einem Reporterelement nach Wahl, welches es ermöglicht, den CB2R zu untersuchen, während sein natürliche Kompetenz erhalten bleibt, andere Liganden in orthosterischer Position zu binden. Eine Proof-of-Concept-Studie begann mit der *in silico*-geführten Kreation eines O-Nitrobenzoxadiazol (O-NBD)-basierten hochaffinen Liganden **I**, der fluorogene Sonde **II** erzeugte. Sonde **II** demonstrierte die kovalente Übertragung des NBD-Reporterelements an einen CB2R-Lysinrest in

der Nähe der orthosterischen Bindungsstelle. Vielversprechende Ergebnisse mit **II** inspirierten die Integration von fortgeschritteneren Elektrophilen und Fluorophoren für die Anwendung in einem zellulären Umfeld. Neue synthetische Strategien wurden entwickelt, um **III** zu untersuchen, wobei **IV** als Plattformreagenz verwendet wurde, das eine effiziente Eingliederung von nicht-kommerziellen Reporterelementen (DY-480XL) und Liganden (**I**) in nur zwei Schritten ermöglichte. Sonde **III** erreichte eine vollständige kovalente Übertragung von DY-480XL und visualisierte den CB2R in endogen exprimierenden Mikrogliazellen.



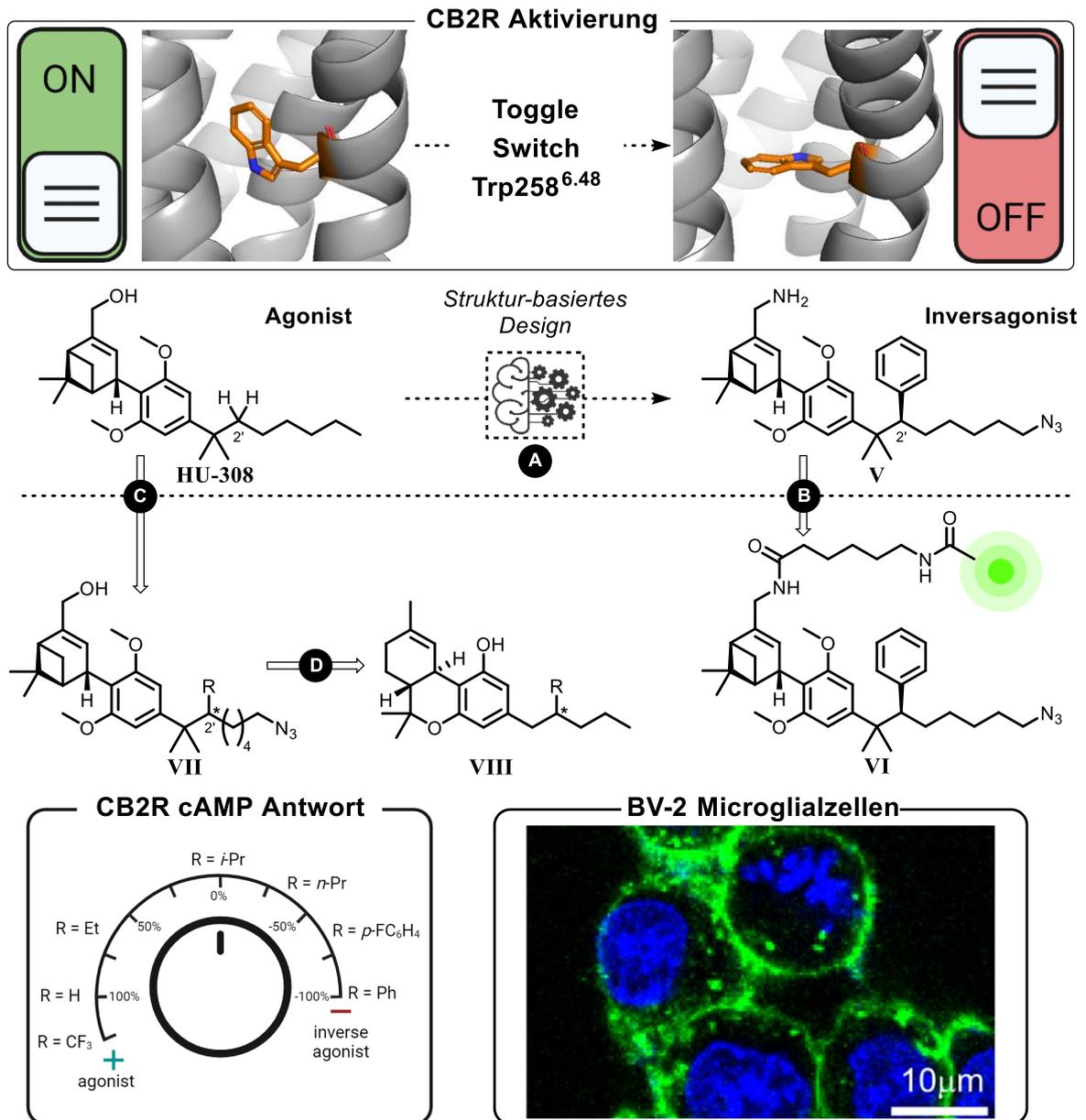
Schema I. (A) Ausarbeitung des privilegierten CB2R-Liganden **I** zur ligandengerichteten kovalenten O-NBD-Sonde **II**. (B) Anwendung des N-Acyl-N-Alkylsulfonamid-Plattformreagenzes **IV** zur Herstellung der Fluorosonde **III**.

Die überwiegende Mehrheit der CB2R-pharmakologischen Werkzeuge sind Agonisten, die auf die aktive Rezeptorpopulation abzielen, während selektive CB2R-Inversagonisten selten sind. Diese Ungleichheit inspirierte die Entwicklung eines vielseitigen CB2R-selektiven Inversagonisten. Ein Phenylsubstituent wurde am C(2') des Agonisten HU-308 eingeführt, was die Aufwärtsbewegung von Trp2586.48 behinderte; der "Toggle-Switch" der CB2R-Aktivierung (Schema II). *In silico*-Studien führten zum Entwurf von Sonde **V**,

die eine ausgezeichnete Affinität für den CB2R und Selektivität gegenüber dem CB1R aufweist.

Auch nach Derivatisierung von **V** mit einer breiten Palette an Substituenten und Fluorophoren behalten diese Sonden ihre hohe Affinität für den CB2R bei, ebenso wie ihre Selektivität und ihr inversagonistisches Funktionsprofil. Die Sonden verhielten sich als Inversagonisten hinsichtlich cAMP-Inhibition und von G-Protein Rekrutierung am CB2R. Die Assoziation von β -Arrestin mit dem Rezeptor wurde nicht gefördert. Darüber hinaus wurde keine CB2R-Aktivierung in lebenden Zellen via Ca^{2+} -Freisetzung und ERK_{1/2}-Phosphorylierung festgestellt. Die mit Alexa488 funktionalisierte Fluorosonde **VI** ermöglichte zusätzlich die Visualisierung des CB2Rs, der auf endogene Niveaus in BV-2-Mikrogliazellen exprimiert wurden, mittels konfokaler Mikroskopie.

Durch eine sorgfältige Auswahl der Substituenten am C(2') konnte eine fein abgestimmte funktionale Rezeptor-Antwort erzielt werden, die zwischen den Extremen des Agonisten und des Inversagonisten liegt. Entsprechend ermöglicht das hier beschriebene Liganden-Set mit **VII** die Feinjustierung einer gewünschten CB2R-Funktionsantwort – dies schliesst Agonisten, neutraler Antagonisten und Inversagonisten ein. Die Erkundung von Pharmakophoren jenseits von HU-308 führte zu einem auf Δ^9 -THC basierenden dualen CB2R-Inversagonisten/CB1R-Antagonisten **VIII**.



Schema II. Strukturgeführte Transformationen des Agonisten **HU-308**; (A) zu Inversagonist **V** durch Einführung eines C(2') Phenylsubstituenten, der mit Fluorophoren konjugiert wurde (B), um **VI** zu erzeugen. (C) Eine Reihe von C(2') substituierten HU-308-Liganden **VII**, die es ermöglicht, maßgeschneiderte CB2R-Funktionsantworten zwischen den Extremen des Vollagonisten und des Vollinversagonisten zu erreichen. (D) Erweiterung zu Pharmakophoren jenseits von HU-308 führte zu einem Δ^9 -THC-basierten dualen CB2R-Inversagonisten/CB1R-Antagonisten **VIII**.