

Nederlandse samenvatting

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was om de *at-line* nanofractionering methodologie voor bioactiviteits- / bioaffiniteitsprofilering van complexe mengsels en de integratie ervan verder te ontwikkelen en vervolgens toe te passen bij het ontdekken van nieuwe geneesmiddelen. Het onderzoek richtte zich voornamelijk op de metabolietprofilering met parallelle bioaffiniteitsbepaling van *lead* kandidaten, gericht op de chemokine receptoren CXCR1, CXCR2, en CXCR3. Daarnaast werd er gewerkt aan het screenen van natuurlijke producten zoals slangengif en paddenstoelextracten voor nieuwe bioactieve verbindingen, gericht op trombine, factor Xa, het angiotensine-converterend enzym (ACE) en de $\alpha 7$ -nicotine acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR). Hiervoor werd *reversed-phase* vloeistofchromatografie (RPLC) of een hydrofiele interactie (HILIC) vloeistofchromatografie gekoppeld aan zowel massaspectrometrie (MS) voor de identificatie van eluerende verbindingen als parallelle bioassays, waarbij *at-line* nanofractionering gebruikt werd als koppelingstechnologie. Het vriesdrogen van de fractioneringsplaten maakte het mogelijk om verschillende bioassays toe te passen zonder verstoring door de organische oplosmiddelen gebruikt in de RPLC or HILIC scheiding. Voor de bioaffiniteitsbepaling van liganden gericht op de chemokine receptoren werd een radioligand bindingsassay toegepast. Bij het screenen van natuurlijke producten werd de biologische activiteit voor de enzymtargets trombine, factor Xa en ACE bepaald met behulp van een op fluorescentie gebaseerde enzymatische assay, terwijl voor $\alpha 7$ -nAChR een cel-gebaseerde Ca^{2+} flux assay werd toegepast. De respons van de bioassays werden uitgezet tegen de tijd om een zogenaamde bioaffiniteits- / bioactiviteitschromatogram te construeren. De hoge-resolutie nanofractionering, meestal 6 s/*well*, maakt het mogelijk de resolutie van de LC scheiding in de respectievelijke bioaffiniteitsprofielen en biologische profielen te bewaren. Op die manier kan op basis van retentietijd en piekvorm een correlatie worden gelegd tussen de pieken gedetecteerd in het bioaffiniteitsprofiel / biologische profiel en de *m/z*-waarden in de geëxtraheerde ionenchromatogrammen (XIC) van de parallelle MS meting.

In **hoofdstuk 2** wordt aandacht besteed aan de optimalisering van de *at-line* nanofractioneringsmethode. Vervolgens is de methode toegepast op bioaffiniteitsevaluatie van mengsels van liganden gericht op de CXCR3 receptor. Er werd aangetoond dat een fractioneringsresolutie van zowel 6 en 12 s goede resultaten opleverde, voor wat betreft de bioaffiniteit-piekresolutie in de RPLC scheiding en daaropvolgende nanofractionering in 96-*well* platen. De detectielimieten in de bioassay lagen binnen het bereik van de IC_{50} -concentraties van de geteste verbindingen (injectievolume 100 μ L). Dit betekent dat hoge affiniteitsbinders gedetecteerd kunnen worden met lage concentraties. Bovendien werd de metabole profilering van de belangrijke CXCR3 *lead* verbindingen, NBI-74330 en VUF11211 bestudeerd. Twee afzonderlijke chromatografische runs van elk monster werden verkregen voor de metabolietidentificatie met MS en de bioaffiniteitsassay (6s fracties). Accurate MS en MS² metingen met een ion-trap-time-of-flight (IT-TOF) MS

maakten een (gedeeltelijke) structuuropheldering van metabolieten in de metabole mengsels mogelijk. De bioaffiniteit werd beoordeeld in een radioligand bindingsassay gebaseerd op de verdringing van [³H]-VUF11211, een getritieerde allosterische laagmoleculegewicht (LMW) CXCR3 ligand. In totaal werden er negen metabolieten van NBI-74330 en acht van VUF11211 gedetecteerd; hun structuren werden (deels) opgehelderd. Een pyridyl-*N*-oxide metaboliet van NBI-74330 en twee gehydroxyleerde metabolieten van VUF11211 bleken een hoge affiniteit bezitten voor CXCR3 receptor. Behalve het NBI-74330 pyridyl-*N*-oxide, een bekende actieve metaboliet van NBI-74330, werden voor beide verbindingen eerder geen andere metabolieten beschreven. De farmacologische relevantie van de bioaffiniteit van twee VUF11211 metabolieten werd bevestigd in een andere radioactieve bindingsassay, waar beide metabolieten het ¹²⁵I-CXCL10-chemokine, een endogene ligand van CXCR3, verdrong. Zoals de resultaten met CXCL10 aantonen kan de methode dus ook worden toegepast op de analyse van chemokine liganden.

Voor **hoofdstuk 3** werd de methode, ontwikkeld voor CXCR3 liganden, overgezet en verder ontwikkeld om de bioaffiniteit en selectiviteit te beoordelen van zowel LMW liganden en chemokines, die binden aan de CXCR1 en/of de CXCR2 receptor. Een belangrijke verbetering was de introductie van een post-kolom split, die de gelijktijdige bioaffiniteitsbeoordelingen MS-identificatie mogelijk maakt. De snelle bioaffiniteitscreening van de metabolische mengsels gegenereerd uit acht LMW CXCR2 liganden toont aan dat de methode in staat is de aanwezigheid van biologisch actieve metabolieten met hoge bindingsaffiniteit te identificeren en hun selectiviteit voor beide geteste receptoren te bepalen. Uiteindelijk werd het metabolietprofiel met parallelle bioaffiniteitsbeoordeling verkregen voor MK-7123, een allosterische modulator van zowel CXCR1 en CXCR2. Er werden drie actieve metabolieten gevonden. Eén van deze actieve metabolieten werd wel in de bioassay gedetecteerd, maar niet met MS vanwege een te lage concentratie in het mengsel of een te lage ionisatie-efficiëntie.

Voor **hoofdstuk 4** werd een *at-line* nanofractioneringsmethode ontwikkeld en met succes toegepast voor het screenen van 39 slangengifmonsters voor trombine en factor Xa-remmers. Een post-kolom split maakte de *hyphenation* mogelijk van de LC scheiding met een parallelle quadrupole-vluchttijd massaspectrometer (q-TOF-MS) analyse en een biologische assay in 384-well platen. De biologische assay is gebaseerd op de vorming van een fluorescerend product na splitsing van op een rhodamine-110 gebaseerde substraat door trombine of factor Xa. In aanwezigheid van een remmer wordt in de plaatlezer een afname in de fluorescentie gemeten. Veel slangengifmonsters vertoonden op enig tijdstip in het chromatogram een verhoging van de fluorescentie; dit werd toegeschreven aan proteaseactiviteit van het slangengif. Bovendien werd een strategie gedemonstreerd voor de snelle identificatie van bioactieve stoffen met als voorbeeld de drie factor Xa-remmers die gevonden werden in het gif van *Daboia russelii russelii*. Tenslotte werd de mogelijkheid bekeken om met deze methode functionele fylogenie of ontogenetische veranderingen te onderzoeken op basis van de vergelijking van de proteaseactiviteitsprofielen van verschillende slangen.

De strategie voor de identificatie van biologisch actieve bestanddelen van slangengiften werd verder ontwikkeld in de analyse van 30 slangengifmonsters op de aanwezigheid van ACE-remmers. Dit wordt beschreven in **Hoofdstuk 5**. Innovaties van de methode zijn het gebruik van een orthogonale HILIC scheiding in de bioassay en nano-LC-MS voor peptidesequentiebepaling. De orthogonale HILIC scheiding werd geïntroduceerd en toegepast op een ruw slangengif waarin ACE-remmers aanwezig zijn. Omdat HILIC dezelfde mobiele-fase componenten gebruikt als RPLC, was de implementatie gemakkelijk te realiseren door de mobiele-fase samenstelling om te keren en de helling van de gradiënt aan te passen ten opzichte van de RPLC scheiding en de kolom uit te wisselen. Voor de scheiding van bioactieve componenten in het mengsel resulteerde het schakelen tussen RPLC en HILIC in een andere elutievolgorde, die vervolgens in het biologische profiel te traceren is. Op die manier kan de bepaling van de accurate massa die overeenkomt met het biologisch actieve verbindings worden verfijnd of zelfs bevestigd. De andere vernieuwing betreft het gebruik van de nano-LC-MS/MS analyse van een bioactieve nanofractie voor de vaststellen van de (gedeeltelijke) peptidesequentie. Deze ontwikkelingen hebben geleid tot de identificatie van een ACE remmer in het slangengif van *Cerastes cerastes cerastes* en van twee ACE remmers in het slangengif van *Crotalus adamanteus*.

In **hoofdstuk 6** werd de *at-line* nanofractioneringsmethode ontwikkeld, geoptimaliseerd en toegepast op de koppeling van een LC scheiding met MS-detectie en een functionele cel-gebaseerde assay voor de detectie van verbindings met activiteit voor $\alpha 7$ -nAChR. Twee verschillende testopstellingen werden gebruikt voor de SH-SY5Y cellen die $\alpha 7$ -nAChR overexpressieerden, zodat zowel agonisten en positieve allosterische modulators (PAM) konden worden geïdentificeerd. De methode werd toegepast bij de screening van het extract van een hallucinogene paddenstoel, *Psilocybe McKennaii*, en resulteerde in de detectie van twee bioactieve stoffen. Het gebruik van complementaire RPLC en HILIC scheidingen vergemakkelijkte de identificatie van *m/z* waarden die overeenkomen met de bioactiviteit.