

# Novel Chemical Probes for the Cannabinoid System

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Westphal, Matthias V.

**Publication date:**

2017

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000255663>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 24543

**Novel Chemical Probes for the Cannabinoid System**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES**

presented by

**MATTHIAS V. WESTPHAL**

M.Sc. LMU Munich

born on 16.07.1987

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner

Prof. Dr. Pablo Rivera-Fuentes, co-examiner

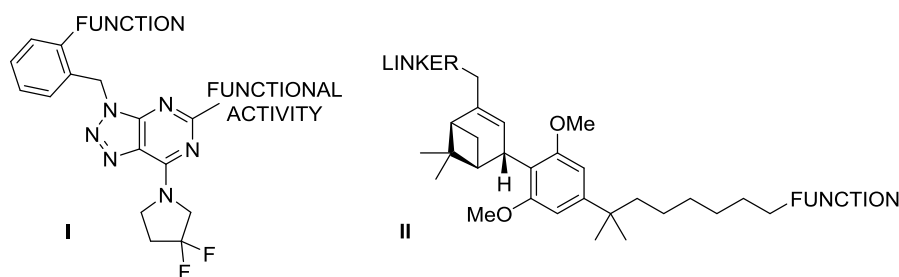
2017

## Abstract

The identification of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol as the primary psychoactive constituent in preparations of *Cannabis sativa* resulted in the discovery of the endocannabinoid system (ECS), which is found in all vertebrates. In the current view, the ECS comprises of two G-protein coupled cannabinoid receptors (CB1 and CB2), their endogenous ligands (endocannabinoids) and enzymes related to endocannabinoid metabolism. The ECS has been shown to be involved in many physiological processes of high relevance to human disease. CB1 is mainly expressed in cells of the central nervous system, while CB2 is mainly represented in cells of the immune system. Since their discovery, both receptors have been subject to intense research efforts in order to understand the effects of cannabinoid signaling on a molecular level. Despite impressive progress, not least enabled by specifically developed chemical tools, the full picture of the complex signaling network remains elusive.

Due to the absence of reliable biochemical tools such as specific antibodies, new small molecule derived chemical probes with specifically tailored selectivity and function would be a great addition to the toolbox of practitioners in the field. In a highly collaborative approach of a team composed of pharmacologists, structural biologists and organic chemists, we set out to develop novel tool compounds for the endocannabinoid system.

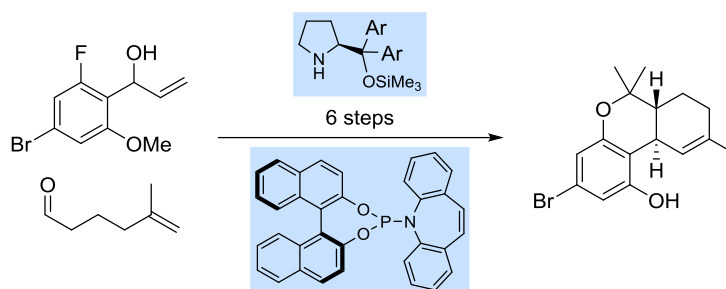
The first part of this thesis describes the synthesis and pharmacological characterization of highly CB2-selective triazolopyrimidines (I) and non-classical cannabinoids (II) with particular focus on added function in the form of (a) electrophilic functional groups (sulfonyl fluorides, isothiocyanate) and (b) photoactivatable groups (diazirines) for cross-linking, and (c) linker attachment enabling the conjugation of fluorophores and other useful moieties (Figure I).



**Figure I.** General structures of novel CB2-selective tool compounds.

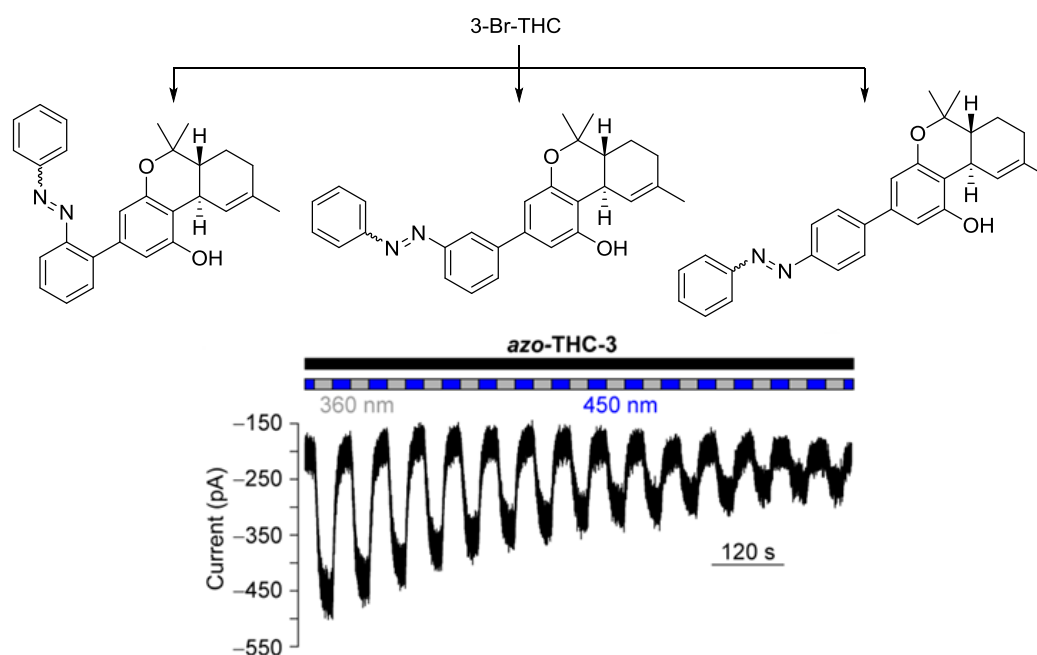
Our efforts culminated in the development of a photoactivatable affinity probe for CB2 allowing for protein detection in overexpressing cells, in the discovery of a probe with exceptionally long CB2 residence time, and in the evolution of a highly CB2 selective fluorophore.

In the second part, we describe the dual-catalytic, enantioselective synthesis of a novel  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol derivative, namely 3-Br-THC (Figure II).



**Figure II.** A dual-catalytic, enantioselective strategy for the synthesis of 3-Br-THC.

The versatility of this building block is demonstrated by its elaboration into several photochromic cannabinoids termed *azo*-THCs (Figure III). Using whole-cell patch clamp electrophysiology, two *azo*-THCs are identified as photoswitchable ligands for CB1. Furthermore, one photoswitch was evaluated in a cyclic adenosine monophosphate assay and shown to exhibit distinct potencies in the *cis* and the *trans* forms.



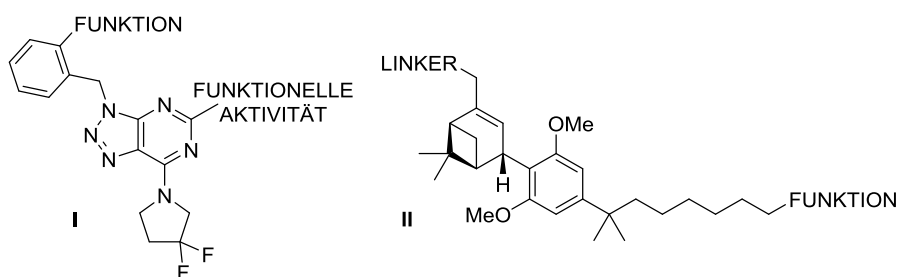
**Figure III.** Synthesis of *azo*-THCs enables optical control of CB1.

## Zusammenfassung

Die Identifizierung des  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinols als hauptsächliche Ursache der psychoaktiven Wirkung von *Cannabis sativa* Zubereitungen führte zur Entdeckung des Endocannabinoid Systems (ECS), welches in allen Wirbeltieren vorhanden ist. In der gegenwärtigen Sicht besteht das ECS aus zwei G-Protein gekoppelten Cannabinoid Rezeptoren (CB1 und CB2), deren endogene Liganden (Endocannabinoide) und Enzymen, die im Endocannabinoid Metabolismus eine Rolle spielen. Das ECS ist bei vielen krankheitsrelevanten physiologischen Prozessen involviert. CB1 wird vornehmlich durch Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert, während CB2 hauptsächlich in Zellen des Immunsystems zu finden ist. Seit ihrer Entdeckung waren beide Rezeptoren Gegenstand intensiver Forschung mit dem Ziel, die Auswirkungen der durch Cannabinoide aktivierten Signalwege auf molekularer Ebene zu verstehen. Trotz des beeindruckenden Fortschritts, der nicht zuletzt durch speziell entwickelte chemische Werkzeuge ermöglicht wurde, ist das Gesamtbild dieses komplexen Signalnetzwerks unzureichend verstanden.

Aufgrund der Nichtverfügbarkeit verlässlicher biochemischer Werkzeuge wie beispielsweise spezifische Antikörper, würden neue chemische Sonden mit massgeschneiderter Selektivität und Funktion einen wertvollen Beitrag leisten. In einer kollaborativen Herangehensweise und einem Team bestehend aus Pharmakologen, Strukturbiologen und Organischen Chemikern haben wir uns der Entwicklung neuer chemischer Werkzeuge für das Endocannabinoidsystem angenommen.

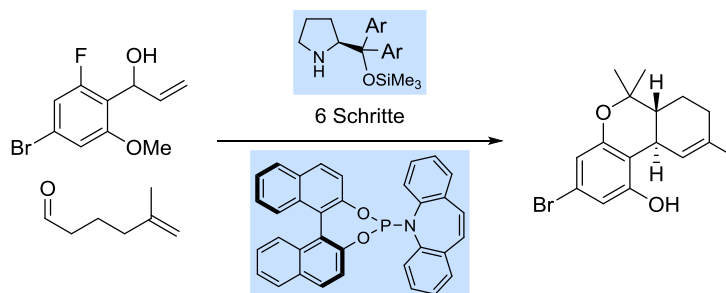
Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Synthese und pharmakologische Charakterisierung von CB2-selektiven Triazolopyrimidinen (I) und nicht-klassischen Cannabinoiden (II) mit besonderem Fokus auf die Implementierung zusätzlicher Funktion in Form von (a) elektrophilen funktionellen Gruppe (Sulfonylfluoride, Thioisocyanate) und (b) photoaktivierbaren Gruppen (Diazirine) zwecks Vernetzung, und (c) einer Linkerbefestigung für die Konjugation von Fluorophoren oder anderen nützlichen Gruppen (Abbildung I).



**Figure I.** Allgemeine Struktur neuer CB2-selektiver molekularer Werkzeuge.

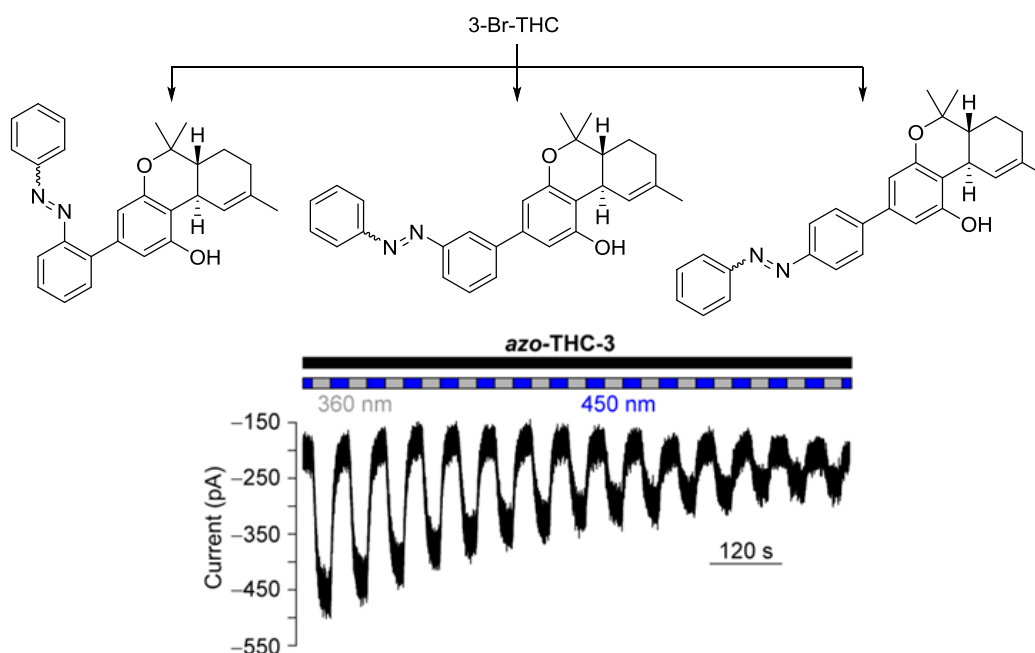
Unsere Bemühungen führten zur Entwicklung einer photoaktivierbaren Affinitätssonde für CB2 zur Proteindetektion in überexprimierenden Zellen, zur Entdeckung einer Sonde mit ausgesprochen langer CB2 Verweilzeit, und der Evolution einer besonders CB2 selektiven Fluoreszenzsonde.

Im zweiten Teil dieser Arbeit beschreiben wir die dual-katalytische, enantioselective Synthese des neuen  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Derivats 3-Br-THC (Abbildung II).



**Figure II.** Eine dual-katalytische Strategie zur Synthese von 3-Br-THC.

Wir demonstrieren die Vielseitigkeit dieses neuen Bausteins durch dessen Umwandlung in einige photochrome Cannabinoide, genannt *azo*-THC Derivate (Abbildung III). Mittels «whole-cell patch clamp» Verfahren zeigen wir, dass zwei *azo*-THC Derivate photoschaltbare CB1 Liganden sind. Des Weiteren wurde ein Ligand im zyklischen Adenosinmonophosphat Assay getestet. Es wurde gezeigt, dass die *cis*- und *trans*-Formen unterschiedliche Aktivitäten aufweisen.



**Figure III.** Die Synthese von *azo*-THC Derivaten ermöglicht die optische Kontrolle von CB1.