GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

Abschlussbericht zum Förderprojekt „Entwicklung kleinmoleküliger Inhibitoren des NLRP3-Inflammasoms“

In Bezug auf den Antrag vom 21. März 2024

an die

Hans & Wolfgang Schleussner-Stiftung

von Enes Görkem Cevik, Alexander Kinner und Dr. Pascal Heitel

In den letzten Jahren hat die Forschung zum Inflammasom des NOD-ähnlichen Rezeptors (engl. NOD-like receptor, NLR) mit Pyrindomäne 3 (NLRP3) erheblich an Bedeutung gewonnen, da er eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt und an der Entstehung verschiedener entzündlicher Erkrankungen beteiligt ist.[1–3] Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt zur Produktion entzündungsfördernder Zytokine, die mit Erkrankungen wie Diabetes, Arteriosklerose und chronisch entzündlichen Erkrankungen in Verbindung stehen.[2,4] Angesichts der schwerwiegenden Gesundheitsfolgen dieser Erkrankungen gewinnt die Entwicklung gezielter Inhibitoren, die die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms hemmen, zunehmend an Interesse. Die zum Zeitpunkt des Projektantrags bekannten NLRP3-Inhibitoren basieren zu einem Großteil auf dem chemischen Grundgerüst von sogenannten Sulfonylharnstoffen, die oft stark eingeschränkte Wirkstoffeigenschaften und schlechte pharmakokinetische Eigenschaften mit sich bringen.[5,6]

Unser Projekt zielt deshalb darauf ab, neue NLRP3-Inhibitoren mit verbesserten Wirkstoffeigenschaften zu identifizieren, um mit diesen chemischen Werkzeugen ein besseres Verständnis für die Mechanismen des NLRP3-Inflammasoms und dessen Hemmung zu erlangen sowie um innovative Ansätze für die Therapie entzündlicher Erkrankungen zu entwickeln. Dafür war es das Ziel dieses Projekts zunächst ein geeignetes Assay-System zu entwickeln, mit dem Inhibitoren identifiziert und charakterisiert werden können.

Die Wahl des Assay-Systems fiel auf einen luciferasebasierten Reportergenassay (Abbildung 1), welcher ein zelluläres Testsystem darstellt und dabei grundlegende Wirkstoffeigenschaften von Liganden, wie beispielsweise Zellpermeabilität voraussetzt. Hierfür wurden Plasmide der NLRP3-Komponenten kloniert, die das NLRP3-Inflammsom in HEK293T-Zellen rekonstituieren. Mithilfe des iGLuc-Reporters lässt sich die Aktivierung des Inflammasoms in ein Lumineszenz-Signal übersetzen.[7] Ein Kontrollplasmid, welches ebenfalls ein lumineszentes Protein exprimiert, aber unabhängig von NLRP3 aktiviert wird, wird als Kontrolle eingesetzt, um auf die Zellzahl zu normieren und die Transfektionseffizienz sowie mögliche zytotoxische Effekte der Testsubstanzen zu überwachen. Die Assaybedingungen wurden in mehreren Schritten systematisch optimiert, beginnend mit der Konzentration der verwendeten Plasmide. Anschließend wurden die Pufferlösungen der Substrate für die Lumineszenz untersucht, wobei es uns gelang das Testsystem so zu stabilisieren, dass das Lumineszenz-Signal über einen Zeitraum

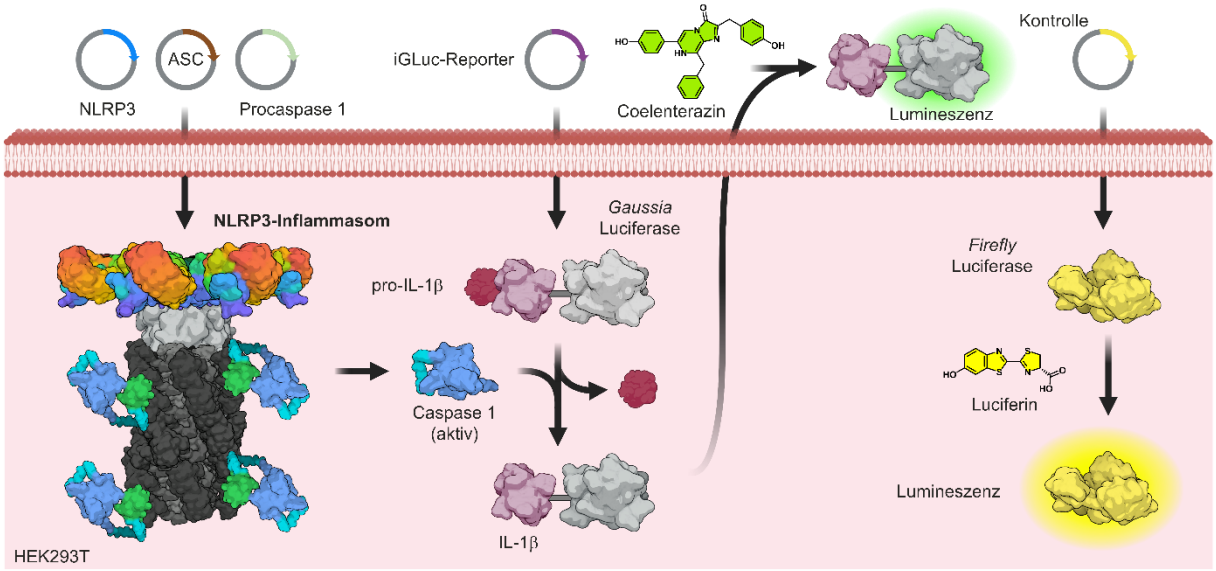

Abbildung 1: Reportergenassay zur Charakterisierung von NLRP3-Inhibitoren. In der humanen Nierenzelllinie HEK293T wird das NLRP3-Inflammasom rekonstituiert. Um die Inhibition des Inflammasoms detektieren zu können, muss die Bindung des Liganden an das NLRP3-Inflammasom in ein Lichtsignal (Lumineszenz) umgewandelt werden. Dafür orientiert man sich am Vorbild von Glühwürmchen und in diesem Fall wird ein Reporter-Konstrukt aus Prointerleukin-1β (Pro-IL-1β) und Gaussia-Luciferase co-transfiziert. Im Ausgangszustand ist die Aktivität der Luciferase gehemmt und die Lumineszenz unterdrückt. Das aktive NLRP3-Inflammasom aktiviert Caspase 1, welche Pro-IL-1β im Reporter spaltet und die Hemmung der Luciferase-Aktivität aufhebt. Ein Lumineszenzsignal kann nach Zugabe des Substrats für die Gaussia-Luciferase erhalten werden. Eine unabhängige Kontrolle wird durch Transfektion der Firefly-Luciferase erreicht. Sie kann unabhängig von NLRP3-Inhibitoren aktiviert werden und dient zur Normierung der Zellzahl, als Transfektions- sowie Toxizitätskontrolle.

von mindestens einer Stunde konstant aufrechterhalten wird (Abbildung 2a). Ebenso wurden Zellzahl, Transfektions- und Inkubationszeiten optimiert. Die Möglichkeit im Assay eine Stimulation des Inflammasoms zu erzeugen, wurde mithilfe der Literatursubstanz Nigericin erfolgreich validiert, welche das Signal um ca. den Faktor 750 steigern konnte (Abbildung 2b). Lediglich die Validierung des Testsystems mit literaturbekannten NLRP3-Inhibitoren stieß auf Schwierigkeiten, da diese die Aktivierung des

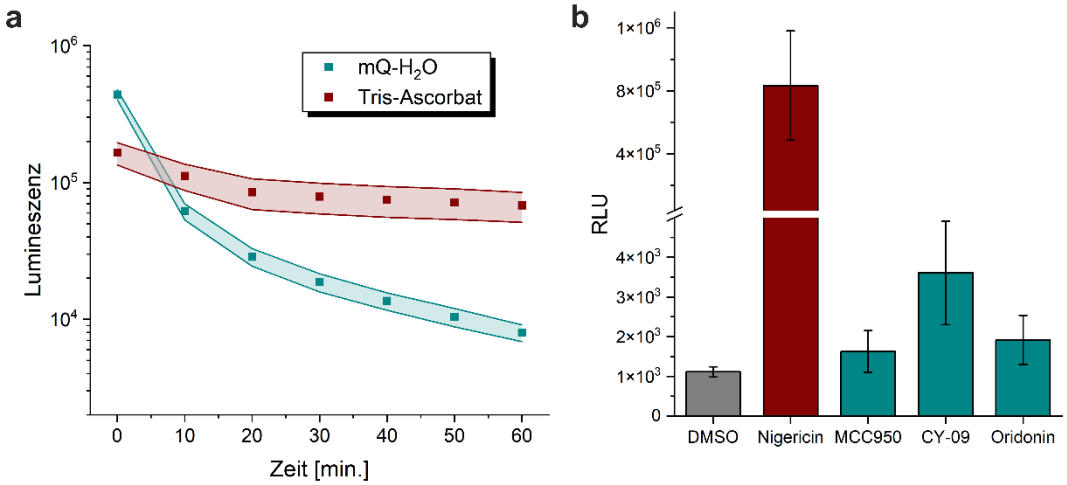

Abbildung 2: Optimierung und Validierung des Reportergenassays. (a) Im Vergleich zu einer wässrigen Lösung konnte ein Tris-Puffersystem mit Zusatz von Ascorbat das Gaussia-Lumineszenz-Signal stabilisieren und liefert ein zeitlich robustes Messsignal. (b) Validierung mit Literatursubstanzen. Der Stimulator Nigericin aktivierte das NLRP3-Inflammasom, während die Inhibitoren MCC950, CY-09 und Oridonin das Signal aufgrund mangelnder Aktivität und/oder zytotoxischen Effekten nicht unterdrückten (RLU – relative Lichteinheiten).

NLRP3-Inflammasoms nicht hemmen konnten oder zytotoxisch waren. Gerade im letzten Punkt ist unser System anderen Assays überlegen, die nicht dazu in der Lage sind, toxische Substanzen zu identifizieren, die falsch positive Messsignale ergeben. Dass die Literaturinhibitoren in unserem System inaktiv waren, bestätigt deren schlechte Wirkstoffeigenschaften und legt die Vermutung nahe, dass sie nicht zellpermeabel sind.[8] Dies verdeutlicht umso mehr, wie wichtig unser Ansatz ist, mithilfe eines geeigneten Testsystems neue NLRP3-Inhibitoren zu identifizieren.

In Ergänzung zum Reportergenassay wurden mit einem ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) und einem Pyroptose-basierten Assay zwei orthogonale Testsysteme etabliert, die beide THP-1 abgeleitete Makrophagen verwenden, die auf natürliche Weise NLRP3 exprimieren. Darüber hinaus sind THP-1 Makrophagen dafür bekannt, extrazelluläre Substanzen aktiv aufzunehmen.[9] Sowohl im ELISA als auch dem Pyroptose-basierten Assay hemmten die Literaturinhibitoren MCC950,[5] CY-09[10] und Oridonin[11] die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Tabelle 1). Dies bestätigt den Verdacht, dass diese Moleküle nicht in die HEK293T-Zellen des Reportergenassay gelangen. Ins Summe stehen uns nun drei Testsysteme zur Verfügung, um neue NLRP3-Inhibitoren zu identifizieren.

Tabelle 1: Zusammenfassung der *in vitro*-Daten für literaturbekannte NLRP3-Inhibitoren. IC_{50} – Konzentration, bei der die halbmaximale Inhibition erfolgt.

Literaturinhibitor	Reportergenassay IC_{50} [nM]	ELISA (IL-1β) IC_{50} [μM]	Pyroptose-Assay IC_{50} [μM]
MCC950	inaktiv	0,0044 ± 0,0007	0,027 ± 0,002
CY-09	inaktiv	0,32 ± 0,01	5,8 ± 1,0
Oridonin	zytotoxisch	1,7 ± 0,2	> 10

Derzeit führen wir das Screening der Prestwick-Substanzbibliothek durch, welche Fragmente von Wirkstoffen enthält. Unabhängig von dieser Methode verfolgen wir einen pharmakophorbasierten Ansatz zur Identifizierung neuer NLRP3-Modulatoren. Dabei wurde die Enamine Substanzbibliothek virtuell gescreent. Von den Treffern wurde mittels molekularen Dockings eine Prioritätsreihenfolge festgelegt (Scoring) und die neun vielversprechendsten chemischen Gerüste eingekauft. Diese werden ebenfalls in Kürze in den Assays getestet werden.

Damit steht das Projekt kurz vor dem Abschluss und wir beabsichtigen nach zusätzlichen Experimenten zur Validierung die Ergebnisse dieses Projekt in einem angesehenen *peer review* Journal zeitnah zu publizieren. Wir möchten uns an dieser Stelle ausdrücklich für die finanzielle Förderung durch die Hans & Wolfgang Schleussner-Stiftung bedanken! Ohne Ihre Unterstützung wäre es uns nicht gelungen, ein Set an Assays für das NLRP3-Inflammasom zu entwickeln, mit deren Hilfe potenzielle Wirkstoffkandidaten für viele Erkrankungen charakterisiert werden können, die im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen stehen. Die mit der Förderung erzielten Forschungsergebnisse liefern die Grundlage für Anträge bei weiteren Institutionen wie z. B. die DFG und helfen mir damit enorm auf dem Weg zur Habilitation.

Frankfurt am Main, den 8.7.2025

Dr. Pascal Heitel
Institut für Pharmazeutische Chemie
Goethe-Universität Frankfurt

Referenzen

(1) Geddes, K.; Magalhães, J. G.; Girardin, S. E. Unleashing the Therapeutic Potential of NOD-like Receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (6), 465–479. https://doi.org/10.1038/nrd2783.

(2) Vande Walle, L.; Lamkanfi, M. Drugging the NLRP3 Inflammasome: From Signalling Mechanisms to Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2024**, *23* (1), 43–66. https://doi.org/10.1038/s41573-023-00822-2.

(3) Fu, J.; Wu, H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2023**, *41*, 301–316. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-021207.

(4) Zhong, Y.; Kinio, A.; Saleh, M.; Kufer, T. A.; Mansell, A. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 333. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333.

(5) Coll, R. C.; Robertson, A. A. B.; Chae, J. J.; Higgins, S. C.; Muñoz-Planillo, R.; Inserra, M. C.; Vetter, I.; Dungan, L. S.; Monks, B. G.; Stutz, A.; Croker, D. E.; Butler, M. S.; Haneklaus, M.; Sutton, C. E.; Núñez, G.; Latz, E.; Kastner, D. L.; Mills, K. H. G.; Masters, S. L.; Schroder, K.; Cooper, M. A.; O'Neill, L. A. J. A Small-Molecule Inhibitor of the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Nat. Med.* **2015**, *21* (3), 248–255. https://doi.org/10.1038/nm.3806.

(6) Dekker, C.; Mattes, H.; Wright, M.; Boettcher, A.; Hinniger, A.; Hughes, N.; Kapps-Fouthier, S.; Eder, J.; Erbel, P.; Stiefl, N.; Mackay, A.; Farady, C. J. Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433* (24), 167309. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2021.167309.

(7) Bartok, E.; Bauernfeind, F.; Khaminets, M. G.; Jakobs, C.; Monks, B.; Fitzgerald, K. A.; Latz, E.; Hornung, V. IGLuc: A Luciferase-Based Inflammasome and Protease Activity Reporter. *Nat. Methods* **2013**, *10* (2), 147–154. https://doi.org/10.1038/nmeth.2327.

(8) Harrison, D.; Billinton, A.; Bock, M. G.; Doedens, J. R.; Gabel, C. A.; Holloway, M. K.; Porter, R. A.; Reader, V.; Scanlon, J.; Schooley, K.; Watt, A. P. Discovery of Clinical Candidate NT-0796, a Brain-Penetrant and Highly Potent NLRP3 Inflammasome Inhibitor for Neuroinflammatory Disorders. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (21), 14897–14911. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.3C01398.

(9) Burnett, R. J.; Lyden, C. A.; Tindal, C. J.; Cave, C. M.; Marra, M. N.; Solomkin, J. S. Mononuclear Cell Line THP-1 Internalizes Bactericidal/Permeability-Increasing Protein by a Non—Receptor-Mediated Mechanism Consistent With Pinocytosis. *Arch. Surg.* **1996**, *131* (2), 200–206. https://doi.org/10.1001/ARCHSURG.1996.01430140090023.

(10) Jiang, H.; He, H.; Chen, Y.; Huang, W.; Cheng, J.; Ye, J.; Wang, A.; Tao, J.; Wang, C.; Liu, Q.; Jin, T.; Jiang, W.; Deng, X.; Zhou, R. Identification of a Selective and Direct NLRP3 Inhibitor to Treat Inflammatory Disorders. *J. Exp. Med.* **2017**, *214* (11), 3219–3238. https://doi.org/10.1084/JEM.20171419.

(11) He, H.; Jiang, H.; Chen, Y.; Ye, J.; Wang, A.; Wang, C.; Liu, Q.; Liang, G.; Deng, X.; Jiang, W.; Zhou, R. Oridonin Is a Covalent NLRP3 Inhibitor with Strong Anti-Inflammasome Activity. *Nat. Commun. 2018 91* **2018**, *9* (1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04947-6.