

University of Groningen

Expanding the toolbox of protein-templated reactions for early drug discovery

Unver, Muhammet

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Unver, M. (2017). *Expanding the toolbox of protein-templated reactions for early drug discovery*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting en perspectief

Ondanks recente ontwikkelingen in technologie en technieken in het ontwikkelen van nieuwe medicijnen, is het ontdekken van nieuwe biologisch actieve verbindingen zeer uitdagend. Het is van het hoogste belang om dit lange traject te verkorten voor medicinale chemici als wel voor farmaceutische bedrijven. In dit proefschrift hebben we ons geconcentreerd op het gebruik van nieuwe strategieën om sneller en efficiënter hits te identificeren, in een vroeg stadium van het proces van medicijnontwikkeling. Om dit doel te bereiken, hebben we gebruik gemaakt van doelwit-gerichte synthese (DGS) waarin het biologische doelwit, in ons geval een eiwit, de vorming van zijn eigen remmers faciliteert vanuit een aantal complementaire bouwstenen. Deze efficiënte techniek versnelt het medicijn-ontdekkingsproces, namelijk hit-identificatie en -optimalisatie, wat de selectie van beste binders mogelijk maakt zonder voorafgaande synthese, zuivering en biochemische evaluatie van elke individuele verbinding.

In Hoofdstuk 1, bespreken we de moeilijkheden in de huidige medicijn-ontwikkeling en hoe dit traject verbeterd en versneld kan worden door gebruik te maken van de DGS benadering. Ten eerste, geven we een algemene introductie over het medicijn-ontdekkingsproces en fragment-gebaseerd medicijn ontwerp (FGMO). Ten tweede, concentreren we op DGS in een breed perspectief en vervolgens op kinetisch DGS (KDGS) in detail. KDGS is een type van DGS benadering waarin de vorming en samenstelling van de remmers plaatsvindt op een irreversibele manier. Deze elegante benadering is al meerdere keren toegepast in medicijn-ontdekking, met name bij hit-identificatie. Desalniettemin staat het nog in de kinderschoenen voor wat betreft het spectrum aan doelwitten en het aantal compatibele reacties. In dit hoofdstuk, presenteren we een gedetailleerd literatuuroverzicht, het spectrum aan reacties en doelwitten als wel een aantal praktische aspecten in het uitvoeren van KDGS-experimenten.

In Hoofdstuk 2, demonstreren we een strategische combinatie van twee bestaande technieken, eiwit-gerichte klikchemie (EGKC) en FGMO, om hit-identificatie te faciliteren. FGMO begint met de identificatie van de fragmenten welke op twee manieren geoptimaliseerd worden: fragment groeien en fragment linken. Fragment-groeien is in de literatuur in meer detail bestudeerd, terwijl fragment-linken zelden gerapporteerd is vanwege de moeilijkheid in het vinden van een verbinding die optimaal past. Daarom streven we er naar om deze uitdaging aan te pakken, aangezien het erg aantrekkelijk is vanwege de potentie voor super-additiviteit. Om deze horde te overwinnen, hebben we gebruik gemaakt van KDGS, namelijk EGKC, om twee fragmenten te linken/optimaliseren tot een remmer van endothiaepsine. We hebben een bibliotheek gegenereerd van aziden en alkynen, afgeleid van fragmenten geïdentificeerd als remmers van endothiaepsine, en hebben de beste combinatie geselecteerd door gebruik te maken van het doelwit zelf in katalytische hoeveelheid. We hebben gebruik gemaakt van de

UPLC-TOF-SIM methode om vier triazolen vanuit 36 mogelijke triazool-combinaties als de beste binders te identificeren. De geïdentificeerde hits hebben IC_{50} waarden van 43–121 μM . Deze methode vertegenwoordigt het eerste voorbeeld van fragment-linken gefaciliteerd door EGKC, wat de eerste triazool-remmer van endothiasepsin oplevert. Aangezien dit werk een principieel bewijs en het doelwit een model-enzym is, hebben we geen verdere rondes van optimalisatie uitgevoerd. De volgende stap van deze methode zou het gebruik echte doelwitten zijn met meerdere rondes van optimalisatie.

In Hoofdstuk 3, presenteren we een nieuwe eiwit-gerichte reactie, de in situ Ugi-vier component reactie (Ugi-4CR), om hit-identificatie te faciliteren door het toegankelijk maken van een groter onderdeel van de chemische diversiteit. Door voor de eerste keer gebruik te maken van een eiwit-gerichte multicomponent reactie, hebben we een bibliotheek van complexe moleculen weten te screenen, afgeleid van twee multicomponent reacties (Ugi-4CR en Passerini) door gebruik te maken van een katalytische hoeveelheid aan eiwit in een zeer korte tijd. Deze nieuwe eiwit-gerichte reactie gaat verder dan EGKC aangezien het simultaan screenen van vier subpockets mogelijk maakt en de geïdentificeerde hits in één synthetische stap bereikbaar zijn. Om dit concept te bewijzen, hebben we een bibliotheek gegenereerd van bouwstenen bestaande uit aldehyden, amines, carbonzuren en isocyaniden en hebben we endothiasepsine in situ gebruikt, wat de selectie mogelijk maakt van twee hits met een laag-micromolaire activiteit (IC_{50} = 1.3 en 3.5 μM) in 18 uur. Dankzij het gebruik van de Ugi-4CR kunnen de remmers op een eenvoudige manier geoptimaliseerd worden. Aangezien dit het eerste voorbeeld in de literatuur is, zou het mechanisme in detail bestudeerd moeten worden en het spectrum van doelwitten en het aantal van multicomponente reacties in de KDGS gereedschapskist uitgebreid moeten worden.

In Hoofdstuk 4, demonstreren we de toepasbaarheid van KDGS in eiwit-eiwit interacties (EEIs) als wel in flexibele bindingsgebieden door gebruik te maken van een nieuwe reactie in KDGS. Door het creëren van een eiwit-gerichte reductieve aminatie konden we een bibliotheek aan potentiële remmers van de p53-Mdm2 EEI screenen en hebben we een hit met een K_i waarde van 0.76 μM geïdentificeerd. Mdm2 heeft een flexibel bindingsgebied, het Leu26 gebied, dat vergroot wordt door het binden van een ligand. Dit maakt de identificatie van remmers met behulp van structuur-gebaseerd medicijn ontwerp (SGMO) of andere computationele technieken zoals virtuele screening moeilijk. Imine chemie heeft meerdere toepassingen gevonden in de dynamische combinatorische chemie (DCC) context en het bevriezen van het evenwicht wordt meestal gedaan door in situ reductie met het risico op verlies aan affiniteit. In ons werk hebben we gebruik gemaakt van een reductieve aminatie reactie in een KDGS setting, door vanaf het begin gebruik te maken van een reductieve reagens, welke de reactie irreversibel maakt. Het

nadeel van het toepassen van deze techniek is de moeilijkheid om de affiniteiten te vergelijken na het reduceren, aangezien de selectie plaatsvindt op het imine stadium. Daarom zou zich toekomstig onderzoek naar deze reactie moeten focussen op het synthetiseren van een nabootser van de imine groep die gevormd wordt in de eiwit-gerichte reactie.

In Hoofdstuk 5, beschrijven we onze pogingen om de gereedschapskist van eiwit-gerichte reacties nog verder uit te breiden door voor de eerste keer in KDGS gebruik te maken van een verestering. In dit werk, hebben we het model enzym endothiapsine gebruikt en een bibliotheek gemaakt van bouwstenen met een alcohol en zuur-/ ester functionele groep. Onze eerste pogingen resulteerden in de gerichte vorming van een ester-remmer vanuit een carbonzuur en een alcohol bouwsteen. Uitgaande van de geoptimaliseerde condities voor de bibliotheekreactie resulteerde niet in de formatie van enig product onder verschillende condities. Er zijn veel nadelen in het gebruik van veresteringsreacties in deze context. Ten eerste is de reversibiliteit van de reactie, welke de vorming van producten in aantoonbare hoeveelheden voorkomt. Ten tweede zou hydrolyse van de esters in de reactiebuffer plaats kunnen vinden, welke nauwlettend in de gaten gehouden zou moeten worden voor de tijdsduur die voor de gerichte-reactie nodig is. Een ander belangrijke punt is het gebruik van een protease als modelenzym. Aangezien deze familie van enzymen verantwoordelijk is voor hydrolyse, zou het gebruik van een andere doelwitfamilie een betere keuze zijn voor toekomstige optimalisatiestudies.

In Hoofdstuk 6, beschrijven we het ontwerp, de synthese en de biochemische evaluatie van bioisosteren van de acylhydrazon-remmer ($IC_{50}=12 \pm 0.4 \mu\text{M}$), welke reeds ontwikkeld was in onze groep en gebruikt werd als leidraadremmer voor hoofdstukken 3 en 5. We hebben drie nieuwe verbindingen gesynthetiseerd en geëvalueerd op hun remmende activiteit van endothiapsine, waaruit de beste bioisosteer endothiapsine remt met een IC_{50} waarde van $27 \pm 8 \mu\text{M}$. We hebben de kristalstructuur van één van de bioisosteren in complex met endothiapsine opgehelderd. Daarom hebben we gedemonstreerd dat het mogelijk is om de gevoelige en hydrolyseerbare acylhydrazon-linker zonder significant verlies in activiteit te vervangen, een belangrijk aspect voor toekomstige medicijn-ontwikkeling.

Samenvattend, is KDGS een zeer succesvolle techniek, die een goedkopere, snellere en efficiëntere hit-identificatie mogelijk maakt. Het hoofddoel van dit proefschrift is de uitbreiding van de gereedschapskist van eiwit-gerichte reacties in termen van reactie en spectrum aan doelwitten. In dit proefschrift, introduceren we drie nieuwe reacties, namelijk in situ Ugi-4CR, reductieve aminering en verestering. Als toevoeging presenteren we een efficiënte combinatie van de technieken fragment-linken en EGKC, die baat heeft bij de voordelen van beide medicijn-

ontdekkingstechnieken en uiteindelijk het ontwerp, de synthese en de biochemische evaluatie van stabiele bioisosteren van acylhydrazonen als remmers van endothiasepsine. Bovendien hebben we Mdmd2 voor de eerste keer als doelwit gebruikt in KDGS, en daarmee de toegevoegde waarde van de techniek aangetoond om flexibele bindingsgebieden te onderzoeken. We zijn er van overtuigd dat de methoden die we ontwikkeld hebben meerdere toepassingen kunnen vinden in hit-identificatie als wel in latere stadia, namelijk hit/ lead optimalisatie tot aan de preklinische fase.

