

VU Research Portal

Fragment-based drug design of small molecule EPHA4 kinase inhibitors

van Linden, O.P.J.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Linden, O. P. J. (2013). *Fragment-based drug design of small molecule EPHA4 kinase inhibitors*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Ontwerp van EPHA4 kinase remmers, door middel van fragment-gebaseerde medicijn ontwikkeling

Dit door STW gefinancierde project was opgezet om nieuwe moleculen te ontwikkelen die de activiteit van de EPHA4 receptor tyrosine kinase remmen. Deze moleculen zouden startpunten zijn in de ontwikkeling van nieuwe medicatie voor de behandeling van huid- en prostaatkanker. Deze EPHA4 remmende moleculen zouden ontwikkeld worden door eerst kleine moleculen (“fragmenten”) te vinden die affiniteit hebben voor EPHA4 en die vervolgens groter te maken en te groeien tot grotere en meer potente verbindingen (Fragment-Based Drug Discovery, FBDD). Een combinatie van biofysische (in het bijzonder NMR), biochemische en *in silico* technieken zouden gebruikt worden om:

- moleculen te identificeren die een interactie met EPHA4 aangaan
- het remmend vermogen van deze fragmenten te verifiëren
- de verdere ontwikkeling van fragment naar medicijn-achtig molecuul te ondersteunen door de affiniteit van reeksen structurele derivaten te bepalen

Met de voor biologische activiteit geoptimaliseerde liganden zouden vervolgens *in vitro* experimenten gedaan worden met behulp van tumorcellen die EPHA4 tot expressie brengen (bijvoorbeeld PC3 cellen). Op die manier kan de activiteit van de verbindingen bepaald worden. Het onderzoek is uitgevoerd in een consortium bestaande uit drie academische groepen met complementaire expertises. De groep van het Leiden Institute of Chemistry (LIC), onder leiding van Dr. Gregg Siegal, is gespecialiseerd in het uitvoeren van biofysische screen methodes. In het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), onder leiding van Dr. Kees Tensen, werden de kinase activiteit studies uitgevoerd. Het ontwerp en de synthese van nieuwe verbindingen (waaronder het werk beschreven in dit proefschrift) werd uitgevoerd aan de Vrije Universiteit te Amsterdam.

Het consortium heeft nauw samengewerkt met drie biotech bedrijven, die aan het project hebben bijgedragen door onder andere hun kinase expertise te delen.

De lage affiniteit die fragmenten doorgaans hebben voor hun target, vereist dat fragment-screening in hoge concentratie geschiedt. Dit introduceert tal van potentiële problemen, waaronder oplosbaarheid issues en aspecifieke binding. De LIC group wist met name door de unieke TINS (Target-Immobilized NMR Screening) technologie toch een aantal interessante hits te identificeren. Het valideren van deze hits bleek echter niet triviaal. De lage affiniteit en oplosbaarheid van de hit fragmenten was een probleem. Daarbij bleek het EphA4 kinase eiwit zich lastig te gedragen tijdens de productie, isolatie en bij het opzetten van de biochemische validatie assay. In een streven om meer potente en beter oplosbare binders te identificeren werden analoge verbindingen van de gevalideerde fragment hits gekocht en getest op EphA4 remmend vermogen. Vervolgens werden er voor drie verschillende chemische klassen derivaten gesynthetiseerd met als doel de atomen en groepen die belangrijk zijn voor binding met EphA4 te identificeren. Deze optimalisaties zijn niet beschreven in dit proefschrift, omdat prioriteit werd gegeven aan hits die verkregen zijn uit *in silico* werk (zoals beschreven in hoofdstuk 3). Die hits kregen prioriteit na bestudering van de Structuur Activiteit Relatie (SAR) zoals afgeleid uit biochemische assays, synthetische toegankelijkheid en patenteerbaarheid.

In **hoofdstuk 3** is de *in silico* identificatie van een nieuw EPHA4 remmend fragment beschreven. Dit fragment werd gevonden door een *pharmacophore* (PH4) model van de ATP bindingsplaats in de EphA4 receptor te construeren. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de structuur informatie die is verkregen uit twee gepubliceerde EPHA4 kristal structuren. Het PH4 model beschrijft de molecuul eigenschappen, die belangrijk zijn voor ligand binding aan de EPHA4 receptor en heeft onder andere geleid tot de identificatie van een *4 op een rij* waterstofbrugmotief in de EPHA4 receptor. *In silico* screenen van een virtuele fragmentenbibliotheek tegen het geconstrueerde PH4 model heeft geleid tot de identificatie van een 6,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrazolo[3,4-*c*]-isoquinolin-1-amine fragment als een nieuwe *hinge* binder van de EPHA4 receptor. De manier waarop het fragment aan EPHA4 bindt werd in eerste instantie bestudeerd door afgeleide

structuren van het hit fragment te synthetiseren. De focus lag hierbij op het synthetiseren van verbindingen, waarbij de structuur van het originele hit fragment uitgebreid (gegroeid) werd in de richting van beschikbare hydrofobe bindingsplaatsen in de zogeheten *kinase back cleft*. Door middel van het aanbrengen van de juiste substituenten kon BP-I, een bindingsplaats die gebruikt kan worden om selectiviteit te verhogen, bereikt worden en werd een remmer met 2 μM (IC_{50}) bindingsaffiniteit en goede Ligand Efficiëntie (zie verder) verkregen.

De opgehelderde structuur van dit kinase-remmer complex bevestigde de binding oriëntatie en de coördinaten van dit complex zijn beschikbaar gemaakt in de *Protein Data Bank* (PDB) onder de code 2xyu. De selectiviteit van de remmer werd bepaald door de activiteiten van de stof te meten op een panel van 124 verschillende kinases. Hieruit bleek dat de remmer een redelijk selectieve kinase remmer is. De gebruikte *in silico* methodiek, ter identificatie en optimalisatie van dit fragment, onderstreept de rol van medicijnonderzoek met assistentie van computers in FBDD.

De volgende stap in het optimalisatie proces van zo een verbinding zou het evalueren van cruciale eigenschappen zoals toxiciteit, biologische beschikbaarheid en oplosbaarheid zijn. Het lipofiele karakter van de verbindingen zou in het verdere optimalisatie proces verminderd dienen te worden. Discussies binnen de FBDD gemeenschap hebben geleid tot de introductie van termen als “moleculair overgewicht”¹⁻² om de problematiek omtrent te lipofiele verbindingen aan de kaak te stellen. Dit heeft er onder meer toe geleid dat optimalisatie parameters, zoals Ligand Efficiëntie, zijn geëvolueerd en informatie over lipofiliciteit in acht nemen. Een voorbeeld hiervan is de LLE_{AT} parameter,³ die geïntroduceerd is door onderzoekers van Astex. Deze nieuwe inzichten hadden gebruikt kunnen worden in het verdere proces. Het optimalisatie proces aan onze EPHA4 hits werd echter gestopt nadat Merck een patent vrijgaf waarin dezelfde EPHA4 remmers werden geclaimd als middelen ter behandeling van kanker en beschadigingen van het zenuwstelsel. De gerapporteerde IC_{50} waardes in dit patent kwamen overeen met de data in dit proefschrift. Hoewel deze publicatie een grote tegenslag voor ons project was, onderstreepte deze tegelijkertijd de efficiëntie van onze aanpak.

Tevens illustreert het de potentie van deze klasse van verbindingen om door middel van EPHA4 remming toekomstige medicijnen voor de behandeling van kanker te kunnen worden.

In de periode dat wij dit hit fragment identificeerde, was er beperkt literatuur beschikbaar waarin de synthese van dit type moleculen beschreven werd. Tijdens de synthese van een cruciaal halffabricaat ontstond er dan ook onzekerheid over de regiochemische identiteit van de geïsoleerde verbindingen. De condensatie reactie van gesubstitueerde 2-aroïyl-cyclohexanonen met 2-cyanoacetamide leverde namelijk twee regio-isomeren, te weten tetrahydroisoquinolines en tetrahydroquinolines. De verhouding waarin deze regio-isomeren gevormd werden leek echter afhankelijk van het elektronische karakter van de *para*-substituent op de phenyl ring van de aroïyl-groep. Om meer inzicht te krijgen in de synthese van deze verbindingen werd de reactie in detail onderzocht en dit is beschreven in **hoofdstuk 4**. De reacties werden uitgevoerd met een strategisch gekozen panel van substituenten, om zo het effect op de verhouding van de geproduceerde regio-isomeren te onderzoeken. Het bleek echter niet mogelijk dit op de conventionele manier te doen en tevens een hoge mate van accuraatheid te waarborgen. De regio-isomeren bleken namelijk erg moeilijk van elkaar te scheiden. Ons streven was daarom een methode op te zetten, waarmee de verhouding tussen de regio-isomeren direct in het ruwe reactiemengsel kon worden gemeten. Om dit te bewerkstelligen werd een procedure bedacht waarmee, met behulp van kwantitatieve ^{13}C NMR spectroscopie, nauwkeurig de hoeveelheden van iedere regio-isomeer gemeten konden worden. Dit heeft geresulteerd in een methode waarbij een verrijkt koolstof-13 atoom werd ingebouwd in de beide regio-isomeren. Het grote oplossend vermogen van de beschikbare 500 MHz Cryoprobe NMR stelde ons in staat onderscheid te maken tussen de ^{13}C signalen van de twee regio-isomeren door middel van geavanceerde 1D en 2D NMR technieken. Semi-empirische MO berekeningen aan de startmaterialen ondersteunen het idee dat een energiekloof tussen de LUMO en de LUMO+, in combinatie met het moeten doorbreken van een activeringspanning, verantwoordelijk zijn voor de uiteindelijke verhouding tussen de twee regio-isomeren. De resultaten van de gepresenteerde Hammett studie hebben ons van inzichten voorzien die van belang zijn voor de organische chemie.

Één aspect, dat onlosmakelijk is verbonden aan de ontwikkeling van kinase remmers, is het selectiviteitprobleem.⁴ Hoewel er zeer selectieve kinase remmers bestaan, blijft het moeilijk deze selectiviteit tijdens het ontwerp van de moleculen in te bouwen. De identificatie van kinase-, groep- of familiespecifieke structurele elementen kan daarom een significante bijdrage leveren aan de ontwikkeling van meer selectieve remmers. Hiertoe is een grondige analyse van kinase-ligand interacties uitgevoerd op alle, publiekelijk beschikbare, humane kinase kristalstructuren. Zogenaamde “Moleculaire *Interactie Vinger Afdrukken*” (Interaction Finger Prints, IFP) zijn gegenereerd om zo de bindingsmodus in >1200 kinase-ligand cokrystal structuren, aanwezig in de PDB, beschrijven. De procedures en resultaten zijn gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. Dit werk heeft geleid tot de *Kinase Ligand Interaction Fingerprint and Structure* (KLIFS) database, die gratis beschikbaar is gemaakt. Deze database bevat van ieder complex de geëxtraheerde, 85 aminozuren tellende, katalytische site en ligand, inclusief de bijbehorende IFP analyse. Deze systematische data-analyse van kinase-ligand complexen heeft ons inzichten verschaft hoe geconserveerde en selectieve kinase interactie *hot spots*, de diversiteit aan kinase liganden kunnen accommoderen. Het vlot groeiende aantal kinase kristal structuren heeft geleid tot de identificatie van nieuwe manieren waarop liganden aan kinase eiwitten kunnen binden. Deze studie draagt dan ook bij aan het vergroten van de kennis omtrent de structurele vereisten van kinase-ligand binding.

Concluderend zijn uiteenlopende aspecten beschreven die belangrijk zijn bij de ontwikkeling van kinase remmers. Door gebruik te maken van beschikbare kristal structuur informatie en *in silico* technieken werden nieuwe, *hinge*-bindende fragmenten geïdentificeerd. Met behulp van organische chemie werden meer potente verbindingen gesynthetiseerd. Fundamentele inzichten in het mechanisme van een cruciale condensatiereactie werden verkregen door een combinatie van organische chemie, geavanceerde NMR spectroscopie en MO berekeningen. Systematische data-analyse van kristalstructuren heeft geleid tot een uitgebreid overzicht van kinase-ligand interacties, die bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe en meer selectieve kinase remmers. Als geheel heeft dit medicinale chemie project meer inzicht verschaft in het efficiënt remmen van de activiteit van EPHA4 en andere kinases.

References

1. Hann, M. M. Molecular obesity, potency and other addictions in drug discovery. *MedChemComm* **2011**, 2, 349-355.
2. Keserü, G. M.; Makara, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 203-212.
3. Mortenson, P.; Murray, C. Assessing the lipophilicity of fragments and early hits. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, 25, 663-667.
4. Bamborough, P.; Brown, M. J.; Christopher, J. A.; Chung, C.-w.; Mellor, G. W. Selectivity of Kinase Inhibitor Fragments. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5131-5143.