

Bericht zur Max-Buchner-Forschungsarbeit

„Design und Synthese kovalenter Anker zur Hemmung von Proteinkinasen“

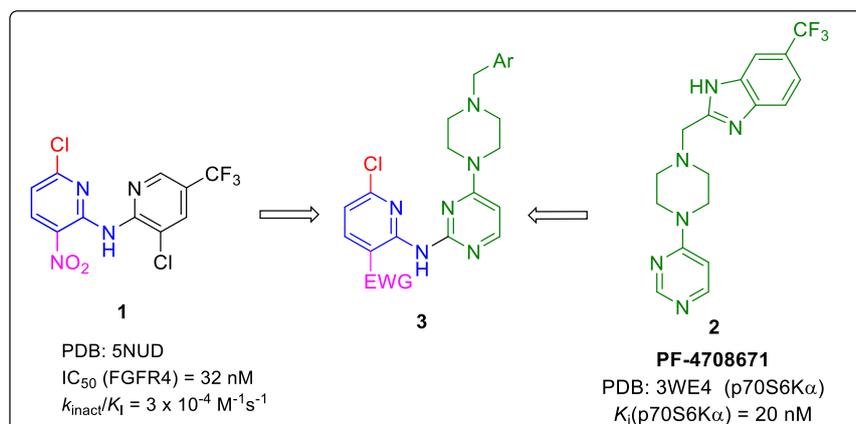
(MBFSt-Kennziffer: 3712)

JProf. Dr. Matthias Gehring, Pharmazeutisches Institut, Abt. Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen

1. Zielsetzung

Ziel des Projekts ist die Etablierung neuer kovalenter Anker, sog. "Warheads" zur Adressierung nicht-katalytischer Cysteine in Proteinkinasen. Dabei soll insbesondere das Konzept der nucleophilen aromatischen Substitution (S_NAr) systematisch untersucht werden.^[1] Als Modellprotein dient die Proteinkinase p70S6K β (S6K2), welche bisher noch nicht mit potenten und spezifischen Inhibitoren adressiert wurde. p70S6K β besitzt ein Cystein in der sog. *hinge*-Region, zwei Aminosäuren nach dem *gatekeeper*-Rest. Ein solches Cystein kommt nur in vier weiteren Proteinkinasen vor (TTK/MPS1, MAPKAPK2, MAPKAPK3 und FGFR4).^[2] p70S6K β stand bisher im Schatten der Isoform p70S6K α (S6K1), welche eine wichtige Rolle im mTOR Signalweg spielt.^[3] Bei p70S6K α nimmt ein Tyrosin die Stelle des erwähnten Cysteins ein. Dies ist zugleich der einzige Rest innerhalb der ATP-Bindetasche, der diese beiden Kinasen unterscheidet und zum Design p70S6K β -selektiver Inhibitoren genutzt werden kann.

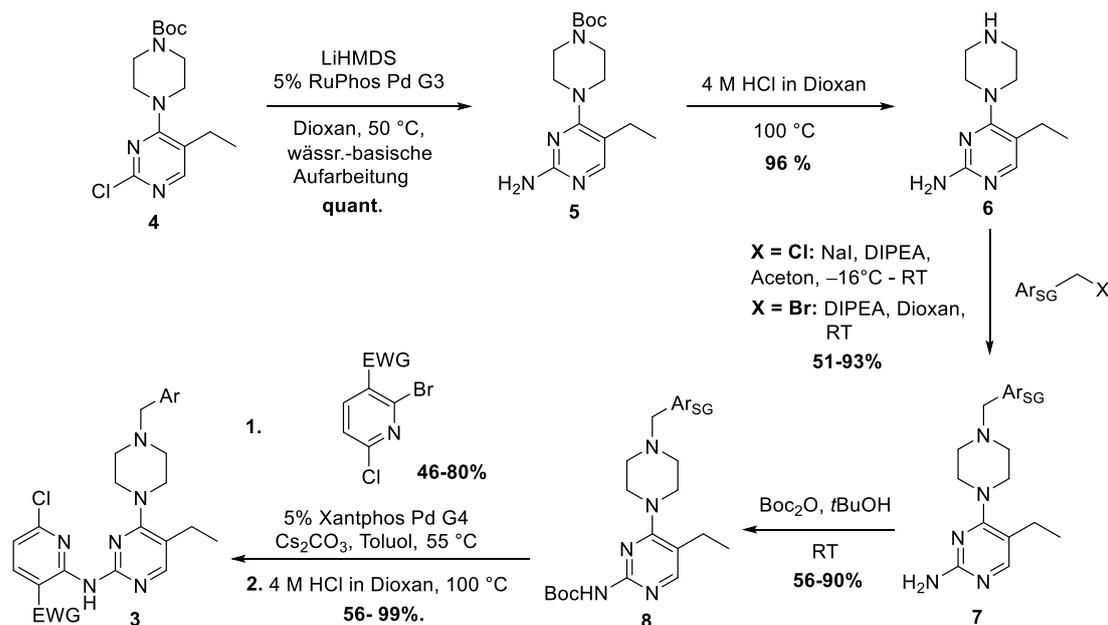
2. Design und Synthese neuer, kovalenter p70S6K β -Inhibitoren



Schema 1: Strategie zur Generierung von p70S6K β -Inhibitoren mit S_NAr -Warhead. Rot markiert ist der Chlor-Substituent, der als Abgangsgruppe in der S_NAr -Reaktion mit dem Thiol des Cysteins dient. Die zu variierende elektronenziehende Gruppe (EWG) ist in Magenta hervorgehoben.

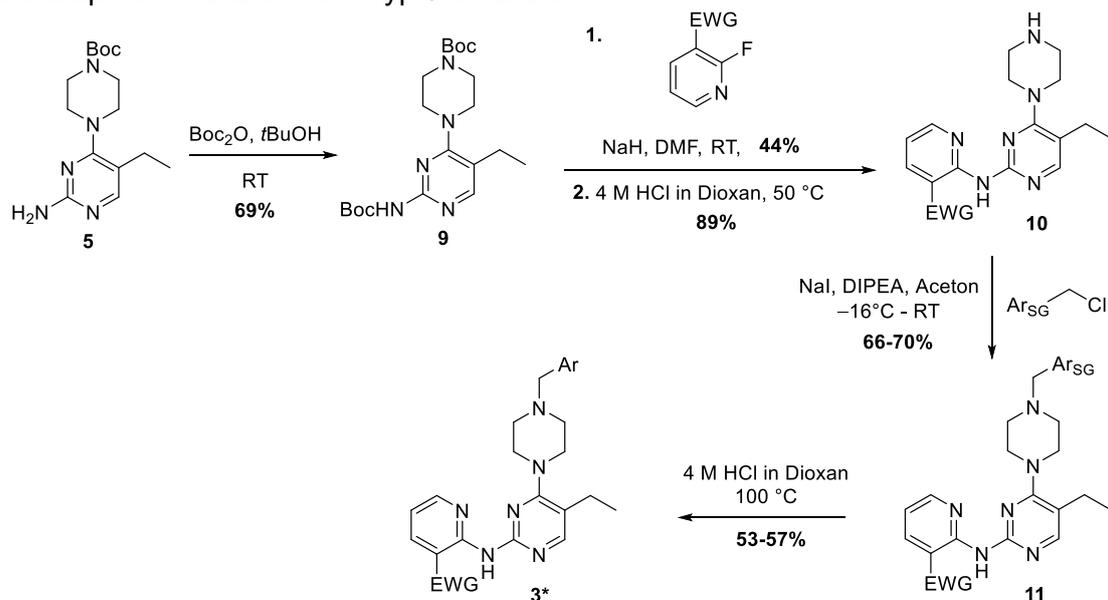
Ausgangspunkt für die Adressierung von Cys¹⁵⁰ der p70S6K β mit S_NAr -basierten Warheads ist eine im Jahr 2017 offengelegte Röntgenkristallstruktur (PDB: 5NUD),^[4] bei der das äquivalente Cystein der FGFR4-Rezeptortyrosinkinase kovalent an die 6-Position eines 2-Amino-3-nitropyridins gebunden ist. Der zugrundeliegende 2-Amino-6-chlor-3-nitropyridin-Vorläufer (Verbindung 1, Schema 1) reagiert dabei in einer S_NAr -Reaktion unter Abspaltung eines Chlorid-Ions mit der FGFR4-Cys⁵⁵² Seitenkette.^[4] Eigene computerbasierte Modellstudien legen nahe, dass sich diese Konzept auch auf p70S6K β übertragen lässt.

Im Rahmen des Projekts sollte der S_NAr -Warhead von Verbindung 1 mit dem bekannten p70S6K α Hemmstoff PF-4708671 (2)^[5] zu Verbindungsklasse 3 verknüpft und Struktur-Aktivitäts Beziehungen untersucht werden. Ein wesentlicher Aspekt ist hierbei die Frage, wie die intrinsische Reaktivität des kovalenten Ankers die Hemmung des Target-Enzyms beeinflusst.



Schema 2: Synthese von p70S6K β -Inhibitoren mit S_NAr-Warhead. Zur Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden auch die Reste am Piperazin variiert.

Zunächst wurde eine geeignete Synthesestrategie für Hybridmoleküle vom Typ **3** etabliert. Diese ging vom Chlorpyrimidin **4** aus (Schema 2), welches über bereits zuvor etablierte Methoden aus 5-Ethyluracil erhalten wurde. Die Einführung einer Aminogruppe in der 2-Position gelang über Pd-katalysierte Kupplung mit LiHMDS als Ammoniak-Surrogat. Wässrig-basische Abspaltung der TMS-Gruppen lieferte Diaminopyrimidin **5**. An dieses wurden nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Piperazin (**6**) die (z.T. geschützten) "oberen" Seitenketten durch nucleophile Substitution angebracht. Die 2-Aminogruppe der erhaltenen Verbindungen **7** wurde Boc-geschützt (**8**), um eine doppelte N-Substitution bei der folgenden Einführung des S_NAr-Warheads durch Buchwald-Hartwig Arylaminierung zu vermeiden. Nach vollständiger Entschützung wurden elektrophile Inhibitoren vom Typ **3** erhalten.



Schema 3: Synthese nicht-reaktiver Kontrollverbindungen.

Zur Untersuchung der Relevanz des kovalenten Bindungsmechanismus am Zielprotein wurden einzelne Inhibitoren ohne Nukleofug dargestellt (Schema 3). Dazu wurde die Synthese so modifiziert, dass die am Piperazin gebundene, obere Seitenkette im vorletzten Schritt angebracht werden konnte. Es wurde Diaminopyrimidin **5** zunächst *N*-Boc geschützt (**9**), um im nächsten Schritt verschiedene Pyridyl-Seitenketten über Deprotonierung/S_NAr-Reaktion einzuführen. Nach Abspaltung beider Boc-Gruppen (**10**) erfolgte die Verknüpfung mit den oberen Seitenketten durch S_N2-Reaktion (**11**). Finale Entschützung führte dann zu den Zielverbindungen **3***.

3. Biologische Untersuchung der dargestellten Verbindungen

Im Rahmen der Förderperiode konnten 14 potenzielle Inhibitoren dargestellt werden. Die Hemmaktivität wurden in einem kommerziellen p70S6K β Enzymassay bestimmt. Dabei wurden mehrere Verbindungen mit IC₅₀-Werten im einstellig nanomolaren Bereich identifiziert. Im Gegensatz dazu zeigten die unreaktiven Analoga keine nennenswerte Hemmaktivität, was den essenziellen Beitrag des kovalenten Bindungsmechanismus unterstreicht.

Die bisher aktivste Verbindung wurde zudem gegen die α -Isoform der p70S6K und alle Kinasen mit äquivalentem Cystein in der *hinge*-Region (s.o.) getestet. Dabei zeigte sich ein exzellentes Selektivitätsprofil, wobei lediglich FGFR4 mit dreistellig nanomolaren IC₅₀-Werten gehemmt wurde. Zudem wies die Schlüsselverbindung eine sehr gute Stabilität der gegenüber Glutathion (pH 7.4) mit einer 10-fach längeren Halbwertszeit als der zugelassene Arzneistoff Afatinib auf. Allerdings zeigte sich auch, dass der Ersatz der Nitrogruppe (vgl. Verbindung **1**) durch Substituenten mit schwächerem –M-Effekt zu einer substanziellen Abnahme der Hemmaktivität führte.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes konnten die bislang ersten hochpotenten und spezifischen p70S6K β Inhibitoren dargestellt werden. Dies gelang durch Anbringung eines elektrophilen Ankers, der über eine S_NAr-Reaktion mit einem Cystein in der *hinge*-Region reagiert. Letzteres kommt in nur in vier weiteren, wenig verwandten Proteinkinasen vor, nicht jedoch in der nahe verwandten α -Isoform. Durch Entwicklung einer neuen Syntheseroute wurden diverse reaktive und nicht-reaktive Inhibitoren zugänglich gemacht. Weitere Analoga werden derzeit dargestellt. Der Einfluss der intrinsischen Reaktivität des Warheads auf die Hemmaktivität und Inhibitionskinetik sowie der Beitrag einer vermuteten intramolekularen Wasserstoffbrücke sind Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

5. Literatur

- [1] M. Gehring, S. Laufer, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5673–5724
- [2] M. Gehring: "Covalent Kinase Inhibitors: An Overview" in *Topics in Medicinal Chemistry* (Springer) **2020**. DOI: 10.1007/7355_2020_103
- [3] O. E. Pardo, M. J. Seckl, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 191.
- [4] R. A. Fairhurst et al., *MedChemComm* **2017**, *8*, 1604–1613.
- [5] L. R. Pearce *Biochem. J.* **2010**, *431*, 245–255.