

Entwicklung und Charakterisierung von Triazolchinazolinderivaten als BMP-Aktivatoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Stefan Lohmann

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Kiel, 2021

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit ist unter Anleitung von Prof. Dr. Dennis Schade in der Zeit von Januar 2017 bis Dezember 2021 an den Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Greifswald (2017-2018) und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2018-2021) angefertigt worden.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dennis Schade
 2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Peifer
- Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021

Kurzzusammenfassung

Knochen-assoziierte Erkrankungen spielen weltweit in der alternden Gesellschaft eine immer größere Rolle. An der pathophysiologischen Entwicklung solcher Erkrankungen kann der Signalweg der *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) beteiligt sein, weshalb die gezielte Beeinflussung der BMP-Aktivität ein therapeutisches Konzept darstellt. Da jedoch die Anwendung von rekombinant hergestelltem BMP durch starke Nebenwirkungen limitiert ist, besteht ein hoher Bedarf an der Entwicklung von niedermolekularen Substanzen mit BMP-aktivierendem Effekt. Als vielversprechende Verbindung wurde das Triazolchinazolin CGS-15943 im Vorfeld der Arbeit in einem phänotypischen Screening identifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Substanz multiperspektivisch zu charakterisieren.

Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) wurde eine „Diversitäts-orientierte“ Synthesestrategie entwickelt und dafür genutzt, neue Leitstrukturderivate darzustellen. Diese wurden im Arbeitskreis u. a. in C2C12-Zellen auf die Fähigkeit zur Förderung der BMP-abhängigen Osteoblastogenese geprüft. Daneben wurden mittels HPLC-Methoden physikochemische Parameter der Leitstruktur bestimmt. Zusätzlich wurden Strategien zur Identifizierung der unbekannten zellulären Zielstrukturen bearbeitet. Mithilfe eines Kinase-Arrays konnte der Einfluss von CGS-15943 auf die Enzyme des humanen Kinoms evaluiert werden. Vertiefende biochemische Untersuchungen zu inhibierten Kinasen wurden an *Full-Length*-Proteinen durchgeführt. Eine Kristallstrukturanalyse sollte letztlich der Ermittlung des Bindemodus der Leitstruktur dienen.

Im Rahmen der SAR-Studie wurden 39 der insgesamt 75 synthetisierten Substanzen biologisch charakterisiert. Einige Derivate wiesen einen dosisabhängigen BMP-amplifizierenden Effekt auf. Mit einer Verbindung gelang es, den Effekt der Leitstruktur deutlich zu übertreffen. Aus den Ergebnissen konnten strukturelle Anforderungen der BMP-Aktivität dieser Substanzklasse abgeleitet werden. Zur physikochemischen Charakterisierung von CGS-15943 wurden die Wasserlöslichkeit und das Verteilungsverhalten bei pH 7,4 bestimmt. Der ermittelte $\log D_{7,4}$ von 2,7 suggeriert eine optimale Permeabilität *in vivo*. Die kinetische Löslichkeit betrug lediglich $4,9 \mu\text{M}$. Zur gezielten Optimierung der Löslichkeit wurde eine *Prodrug*-Strategie konzipiert und erfolgreich bearbeitet.

Verschiedene Methoden zur Entschlüsselung der zellulären Zielstruktur führten zur Identifizierung bestimmter Protein- und Lipidkinasen. Aus dem charakteristischen Aktivitätsprofil wurde ein plausibler Mechanismus für die BMP-amplifizierende Wirkung von CGS-15943 abgeleitet. Zudem wies die Substanz bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eine sehr gute Kinomselektivität auf ($S_{50}=1,23\%$). Für die Hemmung der Zielstrukturen konnten IC_{50} -Werte im mittleren nanomolaren Bereich erhalten werden. Über die biochemische Analyse des Hemmmechanismus und die Aufnahme einer Kristallstrukturanalyse gelang es außerdem, die Inhibition einer der Zielstrukturen durch CGS-15943 detailliert zu charakterisieren.

Folglich ist es gelungen, aus der SAR-Studie eindeutige Erkenntnisse über die strukturellen Anforderungen und die Optimierbarkeit des BMP-aktivierenden Effektes abzuleiten. Mit der vergleichenden Untersuchung des inhibitorischen Effektes ausgewählter Derivate wurde ein wichtiger Beitrag zur Identifizierung und Charakterisierung einer BMP-relevanten Zielstruktur von CGS-15943 geleistet. Zudem wurde die Substanz physikochemisch als gut permeabel jedoch sehr schlecht wasserlöslich charakterisiert. Eine Optimierungsstrategie wurde in Form eines *Prodrug*-Konzeptes erfolgreich erarbeitet. Die Erkenntnisse über den physikochemischen Charakter und die Optimierbarkeit des biologischen Effektes von CGS-15943 bereiten potenziell die Basis für eine biotechnologische oder gar therapeutische Anwendung von Triazolchinazolinderivaten als BMP-Aktivatoren.

Abstract

The prevalence of bone associated diseases is constantly increasing in the aging population. Bone morphogenetic protein (BMP)-signaling may be involved in pathophysiological processes and has recently gained attention as an attractive osteoinductive target. However, the use of recombinant BMPs unfolds high risks of severe adverse drug effects. Hence, to overcome these issues there is a growing need for the development of small molecule-activators of BMP-signaling. Fulfilling this purpose, we identified the triazoloquinazoline CGS-15943. The goal of this work was to characterize this compound in a multi-perspective manner.

In order to efficiently analyze the structure-activity relationship (SAR) of the BMP-amplifying effect a "diversity-oriented" synthesis approach was successfully developed. The generated derivatives were tested for their BMP-dependent osteoinductive potential within the working group utilizing an osteogenic C2C12 differentiation assay. Additionally, the physicochemical characterization of the lead compound was addressed *via* HPLC methods. In order to support the identification of BMP-relevant targets that potentially confer the amplifying effect, a kinase array was employed to investigate the impact of the lead compound on the human kinome. Top kinase candidates were biochemically characterized and a co-crystal structure with kinase-bound CGS-19543 devised for structure-based lead optimization.

Within the course of the SAR study, 39 out of 75 synthesized products were tested. Several compounds showed a dose-dependent BMP-amplifying effect, with one derivative exceeding the original activity of CGS-15943. Furthermore, the combined results of all tested derivatives resolved essential structural requirements for the BMP-activating effect of this compound class.

For assessment of physicochemical properties, efforts were made to determine the water solubility and the lipophilicity of the lead compound. The resulting $\log D_{7.4}$ of 2.7 implies an excellent membrane permeability *in vivo*. However, the kinetic solubility assay unraveled a very low value of 4.9 μM at physiological pH. In order to improve aqueous solubility, a prodrug approach was pursued that successfully furnished a direct synthetic precursor of the designed prodrug.

Different methodologies initiated to resolve the cellular targets of CGS-15943 lead to the identification of specific isoforms of protein and lipid kinases. Given the characteristic activity profile, a plausible mechanism conferring the amplifying effect on BMP-signaling was devised. Furthermore, the lead compound exhibited an excellent kinome selectivity at 1 μM (S_{50} : 1.23%) with low three digit nanomolar IC_{50} values for the key targets. Moreover, the biochemical analysis of the mechanism and a crystal structure analysis yielded decisive information about the inhibition of one of these kinases.

In summary, the SAR-study unraveled fundamental findings about the structural demands and the potential for optimization of the BMP-amplifying effect of CGS-15943. Additionally, an evaluation of selected SAR-derivatives supported the successful identification of a fundamental target for the disclosed effect of the lead compound. The physicochemical characterization implicated an excellent membrane permeability *in vivo* and a very low water solubility. For the latter an optimization approach was successfully set up by the development of a prodrug concept. Moreover, the findings presented in this work deliver essential knowledge about the physicochemical features and the potential for optimizing the biological efficacy for biotechnical and, especially, therapeutic use of triazoloquinazolines as BMP-activators in the future.