

Phenotypic Drug Discovery Campaigns Expand the Chemical and Druggable Space of BMP Stimulators

Dissertation

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

Vorgelegt von
Daniel Florian Riege

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

Kiel, 2023

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Dennis Schade in der Zeit von Februar 2019 bis Juli 2023 an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt.

1. Gutachter Prof. Dr. Dennis Schade
2. Gutachter Prof. Dr. Thomas Kunze
3. Gutachterin Prof. Dr. Christa E. Müller
Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2023

Abstract

The tools of modern medicine have evolved from small-molecules, through biologicals, to entire cells. The emerging discipline of regenerative medicine holds unparalleled potential to transform healthcare and change our perspective on chronic illness. Pluripotent stem cells present a key enabling technology that has opened new paths in the study and treatment of disease. Here, chemical probes provide powerful tools to investigate and manipulate the signaling pathways that orchestrate cell fate decisions on the molecular level. Bone morphogenetic protein (BMP) is a growth factor that regulates physiology from embryonic patterning to adulthood and is associated with various diseases. Despite fundamental physiological roles, the BMP signaling pathway is still not fully understood and chemical tools probing BMP are lacking. Moreover, classic drug discovery has struggled to produce high-quality probes that effectively activate growth factor signaling pathways. To address this issue a phenotypic discovery platform, employing murine embryonic stem cells as an authentic yet high-throughput compatible model, was developed to selectively probe BMP signaling. **Chromenone 1** and **CGS-15943** were identified as novel BMP stimulating chemotypes with unique molecular mechanisms. **Chromenone 1** acts through a kinase-independent feedback loop, enhancing BMP signaling by inhibiting the competing TGF β pathway. **CGS-15943** was found to target CK1 and PI3K isoforms, uncovering a previously unknown link to BMP. Furthermore, strategies were developed to expedite the discovery of BMP stimulators. A proof-of-concept screen identified **Compound 2b** demonstrating the feasibility of targeting noncanonical BMP signaling to synergistically amplify cellular responses. The herein described chemical modalities expand the chemical and druggable space of BMP stimulators, constituting a significant addition to the pharmacological BMP toolbox and illustrate the unique power of phenotypic drug discovery.

Kurzzusammenfassung

Die Werkzeuge der modernen Medizin haben sich von kleinen Molekülen über *Biologicals* bis hin zu vollständigen, funktionalen Zellen entwickelt. Die rasch voranschreitende Disziplin der Regenerativen Medizin besitzt unangefochtenes Potenzial, unsere Sichtweise auf Gesundheitspflege und insbesondere chronische Erkrankungen neu zu definieren. Pluripotente Stammzellen bilden dabei die Schlüsseltechnologie, die neue Wege in der Modellierung und Behandlung von Erkrankungen ermöglicht hat. Entscheidend für die Nutzung von Stammzellen ist es die Signalwege, die die Replikation und Differenzierung steuern, auf molekularer Ebene zu verstehen und kontrollierbar zu machen. Chemische Sonden stellen dabei mächtige Werkzeuge zur Untersuchung und Manipulation dieser Signalwege dar.

Knochen-morphogenetische Proteine (BMP) spielen eine zentrale Rolle im Körper, von der Gewebestrukturierung in der Embryonalentwicklung bis in das Erwachsenenalter. Veränderte BMP-Aktivität ist direkt assoziiert mit einer Vielzahl von Erkrankungen. Trotzdem gibt es aktuell kaum chemische Sonden, die direkt den BMP Signalweg beeinflussen. Dies liegt insbesondere daran, dass klassische Strategien zur Entwicklung neuartiger Moleküle grundsätzlich Probleme bei der Adressierung von Wachstumsfaktor-Signalwegen haben.

Um sich diesem Problem anzunehmen, wurde eine phänotypische *Screening*-Plattform entwickelt, die murine embryonale Stammzellen als Modellsystem nutzt. Diese modellieren authentisch BMP Signale und sind gleichzeitig Hochdurchsatz-kompatibel. Basierend auf dieser Technologie wurden bereits zwei neuartige BMP stimulierende Substanzen entdeckt.

Im Folgenden wurden Testsysteme zur weiteren Validierung und mechanistischen Charakterisierung etabliert und die Wirkmechanismen dieser Substanzen aufgedeckt.

Chromenone 1 verstärkt BMP indirekt durch Inhibition des konkurrierenden TGF β Signalwegs. **CGS-15943** wurde als selektiver Inhibitor von CK1- und PI3K-Isoformen identifiziert und so eine bislang unbeschriebene Verbindung zum BMP Signalweg hergestellt. Zusätzlich wurden weitere Strategien entwickelt, um den chemischen Raum von BMP Stimulatoren zu erweitern. Die Entdeckung von **Substanz 2b** hebt dabei konzeptionell die Machbarkeit einer gezielten Adressierung des nicht-kanonischen Signalwegs hervor.

Zusammenfassend stellen die hier charakterisierten und entdeckten Verbindungen signifikante Erweiterungen der BMP stimulierenden molekularen Werkzeuge dar. Dabei wird das Potenzial phänotypischer Testsysteme für die Entdeckung chemischer Sonden für BMP-bezogene und weitere Anwendungen hervorgehoben.