



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of kinase inhibitors and activity-based probes

Liu, N.

Citation

Liu, N. (2016, December 15). *Development of kinase inhibitors and activity-based probes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44807>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/44807>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44807> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Liu, N.

Title: Development of kinase inhibitors and activity-based probes

Issue Date: 2016-12-15

Samenvatting

Kinasen spelen een belangrijke rol in vele ziekten, zoals kanker, diabetes en infectieziekten. Daarom zijn kinasen een interessante doelgroep voor geneesmiddelen ontwikkeling. Er zijn remmers voor verscheidene kinasen op de markt, maar wegens resistentie, bijwerkingen of gebrek aan remmers voor bepaalde kinase families is het noodzakelijk om onderzoek te doen naar nieuwe klassen van verbindingen gericht op kinasen. Om dit te bereiken moeten er niet alleen nieuwe remmers ontwikkeld worden, maar ook moleculair gereedschappen ("probes"). Deze probes kunnen gebruikt worden om de activiteit en aanwezigheid van kinasen in hun biologische omgeving vast te stellen, te kwantificeren en de selectiviteit van remmers te bepalen. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op de ontwikkeling van potentere AKT1 en FLT3 kinase remmers. Tevens heeft dit onderzoek als doel de synthese en toepassing van nieuwe

probes om de kinasen, die betrokken zijn bij de diverse kankersoorten en andere ziekten, in kaart te brengen. Een korte beschrijving over de functies en de rollen van de kinasen die een onderwerp zijn in dit proefschrift is gegeven in **Hoofdstuk 1**.

In de afgelopen decennia zijn er vele chemische benaderingen ontwikkeld voor het bestuderen van de biologische functionele rol van kinasen, en om de selectiviteit en de doeleiwitten van kinase remmers in kaart te brengen. **Hoofdstuk 2** beschrijft en vergelijkt de principes van drie chemische methodes toegepast op kinase onderzoek: “activity-based protein profiling” (ABPP), “photoaffinity labeling” en “affinity-based profiling (AfBP). Deze drie methodes vormen de rode lijn van dit proefschrift.

H-89, een isoquinolinesulfonamide gebaseerde verbinding, is een welbekende potente PKA remmer. Analogen van deze verbinding remmen tevens AKT1 en andere kinasen, waaronder het oncologische doelwit, FLT3. **Hoofdstuk 3** behandelt het ontwerp en de synthese van een nieuwe set van isoquinolinesulfonamide gebaseerde remmers voor FLT3. Deze verbindingen bevatten allemaal de isoquinolinesulfonamide kern, waarbij variatie is geïntroduceerd op de fenyl groep door gebruik te maken van Suzuki koppeling reacties op de ortho, meta of para positie. Er zijn 34 verschillende omvangrijke (hetero)aromatische boorzuren gebruikt, waardoor er 102 nieuwe isoquinolinesulfonamide analogen zijn ontstaan.

Het biologisch effect van de 102 nieuwe isoquinolinesulfonamides samen met 137 andere isoquinolinesulfonamide analogen, welke in voorafgaande onderzoek zijn gesynthetiseerd, wordt besproken in **Hoofdstuk 4**. De remmingspotentie van deze 239 verbindingen op PKA, AKT1, AKT2 en FLT3 is bepaald aan de hand van een TR-FRET kinase assay. De resultaten uit dit hoofdstuk tonen aan dat zowel AKT1 als AKT2 een voorkeur hebben voor remmers met een omvangrijke heteroaromatische groep op de ortho positie. Dit gegeven maakt het lastig om actieve en selectieve remmers te ontwikkelen voor AKT1. Het is belangrijk om selectieve AKT1 remmers te vinden, gezien eerder onderzoek heeft aangetoond dat remming van zowel AKT1 als AKT2 leidt tot de dood van muizen. In dit onderzoek is aangetoond dat de meest selectieve AKT1 remmers een methyl gesubstitueerde alkeen groep bevatten en de introductie van een halogeen groep op de fenyl ring op de para positie is ook bevorderlijk voor de AKT1 over AKT2 selectiviteit. Een ander kinase dat bestudeerd is in dit proefschrift is FLT3. De meest actieve remmers voor FLT3 bevatten een heterearomatische groep op de para positie van de fenylring.

In het tweede deel van dit proefschrift worden de syntheses en biologische evaluaties van de chemische probes beschreven. Drie verschillende chemische benaderingen worden uitgelicht namelijk: ABPP, AfBP en “photoaffinity labeling”.

Hoofdstuk 5 beschrijft het ontwerp en de synthese van twee typen “activity-based probes” (ABPs) om Bruton’s tyrosine kinase (BTK) te labelen, namelijk directe en tweestaps bioorthogonale ABPs. Directe ABPs bevatten een label, waarmee het doeleiwit direct kan worden gevisualiseerd of geïsoleerd. Tweestaps ABPs daarentegen bevatten

een kleine reactieve groep die kan worden gebruikt om het label in een later stadium te introduceren, nadat de ABP aan zijn doeleiwit heeft gebonden. De ABPs voor BTK zijn gebaseerd op de covalente remmer ibrutinib. Een covalente band wordt gevormd tussen BTK en ibrutinib door een nucleofiele aanval van de cysteine in de actieve holte van BTK op het acrylamide gedeelte van ibrutinib. Resultaten uit dit onderzoek tonen aan de directe probe BTK kan labelen in zowel Ramos cell extract als in levende Ramos cellen. Ook de tweestaps bioorthogonale probes waren in staat om BTK te labelen in *in vitro* en *in situ* experimenten. Labeling met behulp van de directe probes resulteerde in minder achtergrond labeling dan de tweestaps probes.

Niet alle kinasen zoals BTK bevatten een nucleofiele groep in de actieve holte. Om deze kinasen covalent te labelen zijn er andere type chemische gereedschappen vereist.

Hoofdstuk 6 behandelt de synthese en biologische toepassing van twee diazerine-gefunctionaliseerde fotoreactieve probes. Deze probes werden vervolgens gebruikt om PKA en AKT1 te labelen. Beide probes zijn gebaseerd op het chemische structuur van H-89, welke zowel PKA als AKT1 remt, en bevatten een aryl trifluoromethyl diazerine groep als de fotoreactieve groep. De diazerine ring gaat een covalente binding aan met zijn doeleiwit na UV belichting. Daarnaast bevatten deze verbindingen een azide groep, welke gebruikt wordt als de bioorthogonale ligatie handvat. Beide probes waren in staat recombinante PKA en AKT1 te labelen. De probe met een *E*-configuratie was potenter dan de probe met een *Z*-configuratie.

Een derde chemische methode om kinasen te labelen is beschreven in **Hoofdstuk 7**. Een affiniteits-gebaseerde probe werd gesynthetiseerd om doeleiwitten van dasatinib in primaire chronische lymfatische leukemie (CLL) te onderzoeken. Deze affiniteits-gebaseerde probe werd verkregen door een koppeling van de kinase remmer dasatinib aan de NHS-geactiveerde sepharose bollen. In deze methode werden de doeleiwitten reversibel gebonden door de probe en geanalyseerd door middel van SDS-PAGE en/of LC-MS nadat ze geëluëerd werden van de geïmmobiliseerde dasatinib probe. Uit deze studie is gebleken dat c-Abl en BTK de hoofddoeleiwitten van dasatinib in primaire CLL waren. Andere geïdentificeerde doeleiwitten waren: Lyn, Csk, Fyn, Yes, Src and Lck.