



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery of BUB1 kinase inhibitors for the treatment of cancer

Bosman, R.E.J.

Citation

Bosman, R. E. J. (2022, September 29). *Discovery of BUB1 kinase inhibitors for the treatment of cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3464552>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3464552>

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



Samenvatting

Kanker is de overkoepelende term voor ziektes waarin abnormale cellen delen op een ongecontroleerde manier.¹ Deze cellen kunnen zich ontwikkelen in, en vervolgens verspreiden naar verschillende soorten weefsels. *Hallmarks* van kanker, ofwel de vermogens van een biologisch systeem die worden opgedaan tijdens de ontwikkeling van een tumor, omvatten, maar zijn niet gelimiteerd tot, de constante signalering voor celdeling, het bieden van weerstand tegen celdood en metastase.² Daarnaast zijn er karakteristieken die deze *hallmarks* mogelijk maken, zoals genetische instabiliteit.² De ontwikkeling van nieuwe anti-kanker medicijnen kan daarom worden gericht op een of meer *hallmarks* van kanker of de karakteristieken die deze *hallmarks* mogelijk maken.² Het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift omvat verschillende fasen van een geneesmiddelenonderzoek (Figuur 1) en is gericht op het ontdekken van kleine moleculen als kinaseremmers voor de behandeling van kanker.



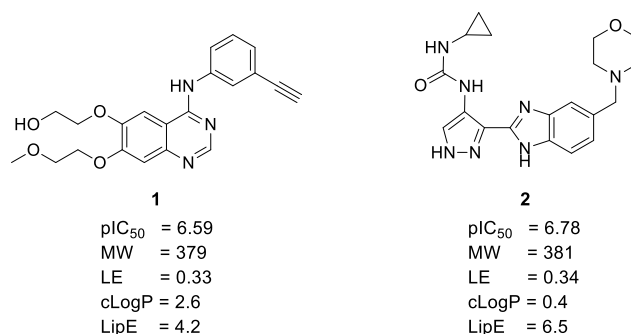
Figuur 1 | Versimpelde weergave van de verschillende fasen van een geneesmiddelenonderzoek.

Het selecteren van een doeleiwit

Eiwitkinasen zijn een prominente klasse doeleiwitten van medicijnen voor de behandeling van kanker.³ Hoofdstuk 1 introduceert het eiwitkinase *budding uninhibited by benzimidazole 1* (BUB1) als therapeutisch doeleiwit. BUB1 maakt deel uit van het zogeheten *spindle assembly checkpoint* (SAC), een beveiligingsmechanisme dat correcte chromosoom segregatie verzekert tijdens mitose.⁴ Veel kankercellen hebben een verzwakt SAC en de hypothese is dat het verstoren van deze verzwakte controlepunten, om zo SAC signalen te ontwrichten, uiteindelijk resulteert in celdood ten gevolge van ernstige chromosoom instabiliteit.^{5,6} Potentiële kinase doeleiwitten van het SAC omvatten *monopolar spindle 1* (MPS1) en BUB1.^{5,6} In het verleden zijn MPS1 remmers ontwikkeld waarvan sommigen in klinische studies zijn onderzocht.⁷⁻⁹ Echter, verschillende muis xenotransplantatie studies waarin MPS1 remmers als monotherapie werden toegediend, lieten alleen een therapeutische werking zien nabij de maximaal getolereerde dosering.¹⁰⁻¹³ Hierdoor was een combinatiebehandeling met taxanen vereist om de gewenste remming van tumorgroei te verkrijgen.¹⁰⁻¹³ Nieuwe remmers met goede fysicochemische eigenschappen, welke zorgen voor de cellulaire BUB1 remmer-eiwit interactie (in het Engels: *target engagement*), kunnen mogelijk een therapeutische werking hebben als monotherapie. Dit zou de combinatiebehandeling met taxanen overbodig maken, wat gewenst is gezien het feit dat deze therapeutische middelen voor ernstige bijwerkingen kunnen zorgen.¹⁴ BUB1 is daarom gekozen als doeleiwit voor het ontwikkelen van nieuwe remmers.

Hit identificatie

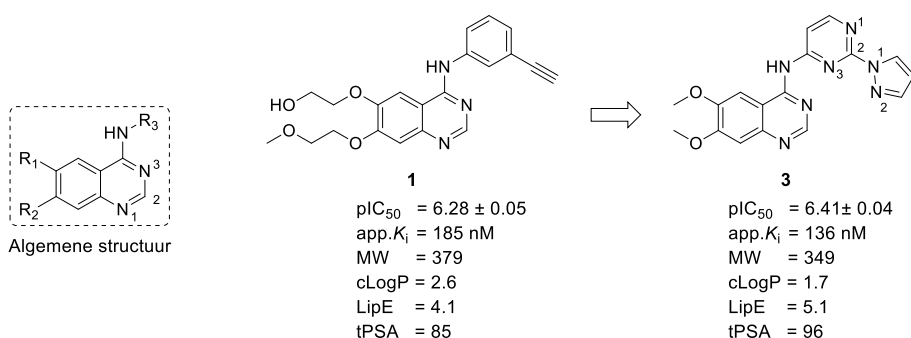
Hoofdstuk 2 beschrijft de resultaten van een *high-throughput screen* (HTS) die is gebruikt voor het ontdekken van nieuwe BUB1 remmers. Een bibliotheek van 53.408 stoffen, verrijkt met kinaseremmers, is gescreend en dit resulteerde in 214 bevestigde actieve stoffen. Na het deselecteren van stoffen die interfereerden met de meetmethode, en dosis-respons experimenten, werd een lijst verkregen van 25 structureel diverse *hits*. *Hits 1* en *2* (**Figuur 2**) werden geprioriteerd op basis van gunstige eigenschappen zoals activiteit, molecuulgewicht, ligand efficiëntie, lipofiliciteit en lipofiele efficiëntie.¹⁵ Beide *hits* zijn opnieuw gesynthetiseerd en hun activiteit kon worden bevestigd.



Figuur 2 | Geprioriteerde *hits 1* en *2* van de *high-throughput screen* en bijbehorende fysicochemische eigenschappen. pIC₅₀: half-maximale inhibitie concentratie van *high-throughput* dosis-respons experiment; MW: molecuulgewicht (g/mol); LE: ligand efficiëntie¹⁵, gedefinieerd als: $LE = (-RT * \ln(\text{app. } K_i)) / HA$, waar HA staat voor het aantal 'zware atomen' (niet-waterstof atomen); cLogP: LogP berekend door DataWarrior (v.5.2.1); LipE: lipofiele efficiëntie¹⁵, gedefinieerd als: $LipE = \text{app. } pK_i - cLogP$.

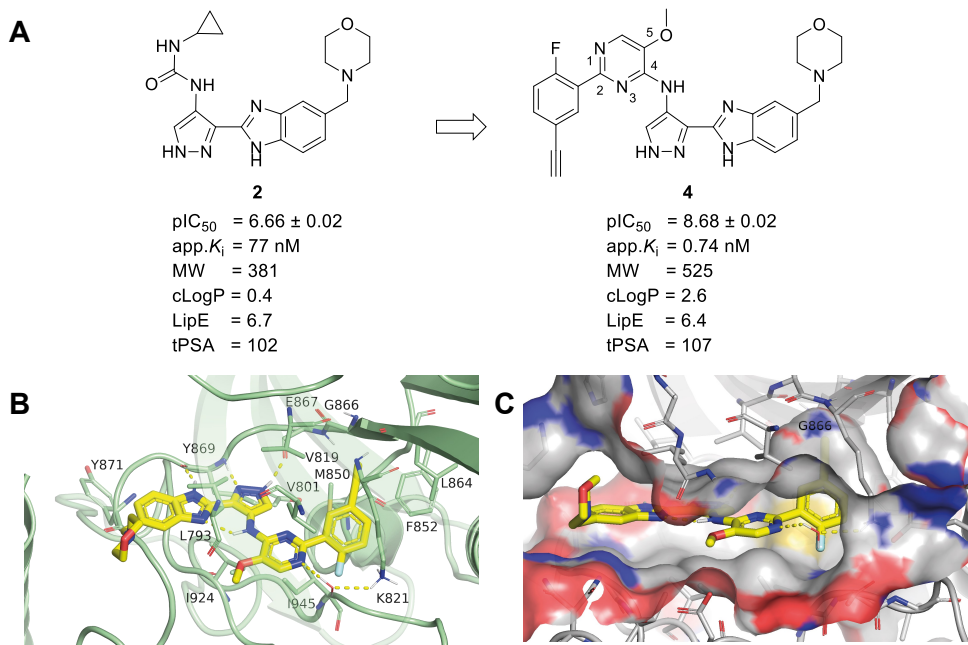
Hit-to-lead optimalisatie

In **Hoofdstuk 3** is de structuur-activiteitsrelatie (SAR) van *hit 1* onderzocht. De synthese en biochemische evaluatie van 48 analoga resulteerde in de identificatie van stof **3** (**Figuur 3**). In vergelijking met *hit 1* was stof **3** aanzienlijk minder lipofiel en door zijn lichtelijk verbeterde activiteit werd een 10-voudige verbetering behaald met betrekking tot de lipofiele efficiëntie. De gemodelleerde bindingsmodi van stoffen **1** en **3** in het kinasedomein van BUB1 kwamen overeen met de geobserveerde SAR. Daar waar de *quinazoline N1* van **1** een waterstofbrug vormde met de *backbone* (ruggengraat) van *hinge* (scharnier-) aminozuur Tyr869, werden geen waterstofbruggen vastgesteld met de *hinge* regio in de gemodelleerde bindingsmodus van stof **3**. In plaats daarvan werd een waterstofbrug voorspeld tussen de pyrazool N2 en zowel Lys821 als Asp946 en daarnaast ook tussen de pyrimidine N1 en Lys821.



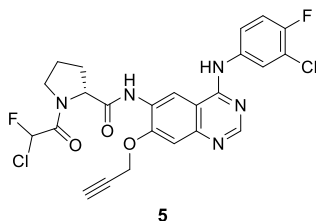
Figuur 3 | Chemische structuren en fysicochemische eigenschappen (zoals gedefinieerd in **Figuur 2**) van *hit 1* en geoptimaliseerde *hit 3*. pIC_{50} : half-maximale inhibitie concentratie, bepaald met de biochemische BUB1 assay; $tPSA$: topological polar surface area ($\text{\AA}^2$), berekend door Chemdraw (v.19.1).

Hoofdstuk 4 beschrijft een uitgebreide structuur-activiteitsrelatie (SAR) studie van *hit 2*. In totaal zijn er 59 analoga gesynthetiseerd en biochemisch geëvalueerd. Dit resulteerde in gesubstitueerde 2-phenyl-5-methoxy-*N*-(3-(5-(morpholinomethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl)pyrimidin-4-amines als zeer actieve BUB1 remmers, waaronder stof **4** (**Figuur 4A**), de meest actieve BUB1 remmer die tot op heden is gerapporteerd. Om de bindingsmodus van **4** te bestuderen, is de kristalstructuur van deze stof in het kinasedomein van BUB1 opgehelderd (**Figuur 4B,C**). Stof **4** bindt in de ATP-*pocket* van BUB1 en laat de regulerende (R)-*spine*¹⁶ intact. Dit geeft aan dat **4** kan worden geclassificeerd als type I remmer.¹⁷ De benzimidazool-pyrazool kern vormt drie waterstofbruggen met de *backbone* van de *hinge* aminozuren Tyr869 en Glu867 van BUB1 (**Figuur 4B**). Een additionele waterstofbrug wordt gevormd tussen de pyrimidine *N*1 en de zijketen van Lys821 welke wordt gemedieerd door een watermolecuul. Verder wordt de morfoline blootgesteld aan het oplosmiddel en de amine tussen de pyrazool en pyrimidine vormt een intramoleculaire waterstofbrug met de stikstof van de benzimidazool. De acetyleen bindt een ruimte welke beschikbaar is door de kleine omvang van het glycine *gatekeeper*-residu van BUB1 (**Figuur 4C**).



Figuur 4 | Hit optimalisatie en kristalstructuur van geoptimaliseerde stof 4 gebonden in het kinasedomein van humaan BUB1. (A) Chemische structuren en fysicochemische eigenschappen (zoals gedefinieerd in **Figuur 3**) van *hit* **2** en geoptimaliseerde stof **4**. **(B)** Kristalstructuur van **4** gebonden in BUB1. Waterstofbruggen zijn gevisualiseerd met stippellijnen (geel) en een watermolecuul is weergegeven als kleine stokjes. β -sheets 1–3 zijn semi-transparant voor visualisatiedoeleinden. **(C)** Weergave van de oppervlakken van aminozuren welke zich binnen 8 Å van **4** bevinden.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling van een cellulaire methode om BUB1 *target engagement* te meten met behulp van *probe* **5**¹⁸ (**Figuur 5**) en gel-gebaseerde, activiteit-gebaseerde eiwitprofieling (Engels: *activity-based protein profiling*, of ABPP). *Probe* **5** en 16 analoga zijn gesynthetiseerd. Om het labelen van BUB1 te onderzoeken is een U2OS cellijn gegenereerd die GFP-FLAG-BUB1 stabiel tot overexpressie brengt. De labeleigenschappen van alle *probes* werden geëvalueerd in deze cellijn en *probe* **5** liet het meest gunstige labelprofiel zien. Het muteren van Cys1080 naar alanine voorkwam het labelen van BUB1 volledig en liet zien dat dit aminozuur verantwoordelijk is voor het vormen van een covalente binding. Het labelen van BUB1 door *probe* **5** was dosis- en tijdsafhankelijk en het labelen kon dosisafhankelijk worden voorkomen door BUB1 remmer BAY1816032.¹⁹ Dit gaf *proof-of-principle* voor het gebruik van **5** als BUB1 chemische *probe* welke het onderzoeken van BUB1 *target engagement* mogelijk maakt, gebruikmakend van gel-gebaseerde ABPP.



Figuur 5 | Chemische structuur van *probe 5*.¹⁸

Hoofdstuk 6 focust op de verdere profilering van een aantal van de gesubstitueerde 2-phenyl-5-methoxy-*N*-(3-(5-(morpholinomethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl)pyrimidin-4-amine BUB1 remmers die in **Hoofdstuk 4** zijn geïdentificeerd om hun potentieel als *lead* kandidaat voor therapeutische doeleinden te onderzoeken. Hiertoe is de *drug-likeness* ('medicijn-gelijkenis') onderzocht door middel van verschillende *in vitro* absorptie, verdeling, metabolisme en uitscheiding (Engels: *absorption, distribution, metabolism and excretion*, of ADME) assays. Daarnaast is cellulaire BUB1 *target engagement* onderzocht, gebruikmakend van de methode die is ontwikkeld zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. Er werd een sterke correlatie gevonden tussen de biochemische pIC₅₀ waarden en BUB1 *target engagement* (Pearson's *r*: 0.921, *p*-waarde: 0.0004). Dit suggereerde dat de cel permeabiliteit van de stoffen die werden getest vergelijkbaar was en dat *target engagement* voornamelijk werd beïnvloed door de affiniteit voor BUB1. Verder werden de effecten op proliferatie van U2OS cellen onderzocht door middel van Sulforhodamine B (SRB) assays. Deze assays werden uitgevoerd met en zonder een lage dosis van paclitaxel om een potentieel synergistisch effect te onderzoeken tussen het remmen van BUB1 en paclitaxel.¹⁹ Een minder sterke correlatie werd gevonden tussen BUB1 *target engagement* en de pIC₅₀ waarden van de SRB assays (Pearson's *r*: 0.655, *p*-waarde: 0.056). Dit suggereerde dat de remming van proliferatie van cellen grotendeels afhankelijk is van BUB1 remming, maar dat *off-target* activiteit bijdraagt aan het geobserveerde effect. ROB433 (**6**) en ROB464 (**7**) lieten het meest gunstige profiel zien (**Figuur 6**, **Tabel 1**) met goede fysicochemische eigenschappen, subnanomolaire affiniteit voor BUB1, goede cellulaire BUB1 *target engagement* en een acceptabel *in vitro* ADME-profiel. De kinase selectiviteit van beiden stoffen is daarom onderzocht. Op een concentratie van 100 nM waren ROB433 en ROB464 selectief over 346 en 352 kinasen, respectievelijk, terwijl 49 (ROB433) en 44 (ROB464) kinasen werden gedetecteerd als *off-target*. Tot slot zijn de antiproliferatieve effecten van ROB433 (**6**) onderzocht in een screen op 102 kankercellijnen. De concentratie die benodigd was om half-maximale remming van celgroei te bereiken (GI₅₀) varieerde van 101 nM (voor KG-1 cellen) tot 5,57 µM (voor THP-1 cellen). De gemiddelde GI₅₀-waarde van alle cellijnen was 1.43 µM. Dit gaf aan dat ROB433 een gunstig cytotoxiciteitsprofiel heeft.

Tabel 1 | Overzicht van fysicochemische eigenschappen (zoals gedefinieerd in **Figuur 3**), ADME eigenschappen, oplosbaarheid in water en activiteiten van *lead* stoffen ROB433 (**6**) en ROB464 (**7**).

	ROB433	ROB464		ROB433	ROB464
Biochemische activiteit (pIC ₅₀ ± SEM)	8.57 ± 0.02	8.62 ± 0.03	Target engagement (pTE ₅₀ ± SEM)	7.50 ± 0.11	8.01 ± 0.09
Apparent K_i (nM)	0.94	0.84	Proliferatie U2OS cellen (pIC ₅₀ ± SEM)	6.32 ± 0.06	7.39 ± 0.05
Molecuulgewicht (g/mol)	535	553	Plasma stabiliteit (% restant na 180 min)	100 (h)* 100 (r)* 85 (m)*	100 (h) 100 (r)
cLogP	3.1	3.2	Microsomale stabiliteit (t _{1/2} in min)	41 (h) 63 (r) 22 (m)	29 (h) 49 (r) 6.1 (m)
LipE	5.9	5.8	Microsomale klaring (μL/min/mg)	8.4 (h) 22 (r) 16 (m)	12 (h) 28 (r) 57 (m)
tPSA (Å ²)	107	107	Plasma eiwitbinding (%)	100 (h) 100 (r) 99.9 (m)	99.7 (h) 99.7 (r)
			Oplosbaarheid in water (μM)	4.4	6.0

Tot slot

239

Samenvatting

kankersoorten die op dit moment geen moleculair *target* hebben, zoals triple-negatieve borstkanker.

Bronnen

1. NCI Dictionary of Cancer Terms. (accessed in September 2021)
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>.
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P. A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 551–569 (2021).
4. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
5. Dominguez-Brauer, C., Thu, K. L., Mason, J. M., Blaser, H., Bray, M. R. & Mak, T. W. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol. Cell* **60**, 524–536 (2015).
6. Kops, G. J. P. L., Weaver, B. A. A. & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 773–785 (2005).
7. Mason, J. M., Wei, X., Fletcher, G. C., Kiarash, R., Brokx, R., Hodgson, R., Beletskaya, I., Bray, M. R. & Mak, T. W. Functional characterization of CFI-402257, a potent and selective Mps1/TTK kinase inhibitor, for the treatment of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 3127–3132 (2017).
8. Wengner, A. M., Siemeister, G., Koppitz, M., Schulze, V., Kosemund, D., Klar, U., Stoeckigt, D., Neuhaus, R., Lienau, P., Bader, B., Prechtel, S., Raschke, M., Frisk, A.-L., von Ahsen, O., Michels, M., Kreft, B., von Nussbaum, F., Brands, M., Mumberg, D. & Ziegelbauer, K. Novel Mps1 Kinase Inhibitors with Potent Antitumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 583–592 (2016).
9. Anderhub, S. J., Mak, G. W.-Y., Gurden, M. D., Faisal, A., Drosopoulos, K., Walsh, K., Woodward, H. L., Innocenti, P., Westwood, I. M., Naud, S., Hayes, A., Theofani, E., Filosto, S., Saville, H., Burke, R., van Montfort, R. L. M., Raynaud, F. I., Blagg, J., Hoelder, S., Eccles, S. A. & Linardopoulos, S. High Proliferation Rate and a Compromised Spindle Assembly Checkpoint Confers Sensitivity to the MPS1 Inhibitor BOS172722 in Triple-Negative Breast Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 1696–1707 (2019).
10. Kusakabe, K., Ide, N., Daigo, Y., Itoh, T., Yamamoto, T., Hashizume, H., Nozu, K., Yoshida, H., Tadano, G., Tagashira, S., Higashino, K., Okano, Y., Sato, Y., Inoue, M., Iguchi, M., Kanazawa, T., Ishioka, Y., Dohi, K., Kido, Y., Sakamoto, S., Ando, S., Maeda, M., Higaki, M., Baba, Y. & Nakamura, Y. Discovery of Imidazo[1,2-*b*]pyridazine Derivatives: Selective and Orally Available Mps1 (TTK) Kinase Inhibitors Exhibiting Remarkable Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **58**, 1760–1775 (2015).
11. Martinez, R., Blasina, A., Hallin, J. F., Hu, W., Rymer, I., Fan, J., Hoffman, R. L., Murphy, S., Marx, M., Yanocho, G., Trajkovic, D., Dinh, D., Timofeevski, S., Zhu, Z., Sun, P., Lappin, P. B. & Murray, B. W. Mitotic Checkpoint Kinase Mps1 Has a Role in Normal Physiology which Impacts Clinical Utility. *PLOS ONE* **10**, e0138616 (2015).
12. Maia, A. R. R., de Man, J., Boon, U., Janssen, A., Song, J.-Y., Omerzu, M., Sterrenburg, J. G., Prinsen, M. B. W., Willemsen-Seegers, N., de Roos, J. A. D. M., van Doornmalen, A. M., Uitdehaag, J. C. M., Kops, G. J. P. L., Jonkers, J., Buijsman, R. C., Zaman, G. J. R. & Medema, R. H. Inhibition of the spindle assembly checkpoint kinase TTK enhances the efficacy of docetaxel in a triple-negative breast cancer model. *Ann. Oncol.* **26**, 2180–2192 (2015).
13. Schulze, V. K., Klar, U., Kosemund, D., Wengner, A. M., Siemeister, G., Stöckigt, D., Neuhaus, R., Lienau, P., Bader, B., Prechtel, S., Holton, S. J., Briem, H., Marquardt, T., Schirok, H., Jautelat, R., Bohlmann, R., Nguyen, D., Fernández-Montalván, A. E., Bömer, U., Eberspaecher, U., Brüning, M., Döhr, O., Raschke, M., Kreft, B., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., Brands, M., von Nussbaum, F. & Koppitz, M. Treating Cancer by Spindle Assembly Checkpoint Abrogation: Discovery of Two Clinical Candidates, BAY 1161909 and BAY 1217389, Targeting MPS1 Kinase. *J. Med. Chem.* **63**, 8025–8042 (2020).
14. Markman, M. Managing taxane toxicities. *Support. Care Cancer* **11**, 144–147 (2003).
15. Hopkins, A. L., Keserü, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C. & Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 105–121 (2014).
16. Taylor, S. S. & Kornev, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 65–77 (2011).
17. Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
18. Shindo, N., Fuchida, H., Sato, M., Watari, K., Shibata, T., Kuwata, K., Miura, C., Okamoto, K., Hatsuyama, Y., Tokunaga, K., Sakamoto, S., Morimoto, S., Abe, Y., Shiroishi, M., Caaveiro, J. M. M., Ueda, T., Tamura, T., Matsunaga, N., Nakao, T., Koyanagi, S., Ohdo, S., Yamaguchi, Y., Hamachi, I., Ono, M. & Ojida, A. Selective and reversible modification of kinase cysteines with chlorofluoroacetamides. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 250–258 (2019).
19. Siemeister, G., Mengel, A., Fernández-Montalván, A. E., Bone, W., Schröder, J., Zitzmann-Kolbe, S., Briem, H., Prechtel, S., Holton, S. J., Mönning, U., von Ahsen, O., Johanssen, S., Cleve, A., Pütter, V., Hitchcock, M., von Nussbaum, F., Brands, M., Ziegelbauer, K. & Mumberg, D. Inhibition of BUB1 Kinase by BAY 1816032 Sensitizes Tumor Cells toward Taxanes, ATR, and PARP Inhibitors *In Vitro* and *In Vivo*. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1404–1414 (2019).