

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Vorhabenbezeichnung:

PROTACs basierend auf neuen E3 Liganden und strukturierten Linkern (**NewPRO**)

Förderkennzeichen: 03ZU1109FA (GUF), 03ZU1109FB (Merck); 03ZU1109FC (MPI);
03ZU1109FD (TUDa)

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2021 – 31.12.2024

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Darmstadt

Prof. Dr. Stefan Knapp (Johann Wolfgang-Goethe-Universität, Fachbereich 14)

Prof. Dr. Ivan Dikic, (Johann Wolfgang-Goethe-Universität, Fachbereich 16)

Prof. Dr. Felix Hausch (Technische Universität Darmstadt)

Prof. Dr. Gerhard Hummer (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt)

Dr. Paul Gehrz und Dr. Ingo Hartung (Merck Healthcare KGaA, Darmstadt)

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor

Teil II: Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)

1. Avisierte Ziele der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Zu Beginn des Projekts wurden selektive chimäre „Degrader“ (PROTACs) fast ausschließlich auf der Basis von Cereblon und VHL E3 Liganden entwickelt. Diese Situation hat sich nicht wesentlich geändert, da die Etablierung eines neuen PROTAC-Liganden umfangreiche Charakterisierungsarbeiten erfordert. Die E3 Ligase Familie ist jedoch eine der größten Proteinfamilien im menschlichen Proteom mit vielen potentiell „druggable“ E3 Ligasen. Ziel des Projektes NewPRO war es daher, neue E3 Ligase Liganden für die Entwicklung von PROTACs zu etablieren. Um eine umfassende Evaluierung zu ermöglichen, sollten zunächst nicht-selektive POI (Protein of Interest) Liganden verwendet werden um einen möglichst großen Target Raum abzudecken. Das Projekt hat eine offene wissenschaftliche und eine potentiell kommerziell nutzbare Seite. Die offene Seite des Projektes soll POC (proof of concept) Studien mit bekannten E3 Liganden, die bisher noch nicht oder nur mit einzelnen Beispielen für die Entwicklung von PROTACs verwendet wurden, ermöglichen. Nach erfolgreicher Validierung der ausgewählten Liganden und Linker-Konjugate können diese Konzepte dann für neue, kommerziell nutzbare „Degrader“ verwendet werden. Insgesamt **sollten 6 E3-PROTAC Systeme** untersucht und **validiert bzw. de-validiert** werden. Für die Entwicklung von Zielstrukturspezifischen PROTACs sollten rigide Linker entwickelt werden

und die Optimierung dieser PROTACs sollte durch strukturbasierte experimentelle oder in silico Studien unterstützt werden.

2. Ablauf des Vorhabens, Ergebnisse, Verwertung

2.1 Etablierung eines Arbeitsprogramms für die Validierung von neuen E3 Ligase Liganden.

PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) haben als neue Modalität in der Arzneimittelforschung große Aufmerksamkeit erregt und die Diversität der humanen E3-Ligasefamilien verspricht in Zukunft die Entwicklung neuartiger Abbaumechanismen mit neuen pharmakologischen Eigenschaften. Im ersten Teil des Projektes haben wir einen Arbeitsablauf entwickelt, der darauf abzielt, die Effizienz von E3-Liganden für die PROTAC-Entwicklung und den mit diesen PROTACs „abbaubaren“ Target Raum zu erfassen. Um einen möglichst großen Target-Raum abzudecken, wurden nicht selektive Kinase-Inhibitoren verwendet. So konnte nur mit einem einzigen PROTAC Molekül mehr als hundert Kinasen adressiert werden. Um ein Arbeitsprogramm der Ligandvalidierung zu etablieren, wurde zunächst der gut etablierte **VHL**-Ligand VH032 verwendet. Unsere Studie zeigte, dass VH032 Linker-Konjugationsstellen besitzt, die hocheffizient für den Kinaseabbau sind, und andere, die zu inaktiven PROTACs führen. Der Vergleich der Abbauaktivitäten der insgesamt 12 entwickelten VHL-basierten PROTACs gab Aufschluss über die effektivsten Linker- und Konjugationsstellen an den verwendeten Kinase-Inhibitoren und VH032. Darüber hinaus wurden Mechanismen wie die allgemeine Zytotoxizität aufgeklärt, die zu einem PROTAC- und VHL-unabhängigen Kinaseabbau führen können. Die Verwendung von E3-Liganden-Negativkontrollen, Competitionsexperimenten mit VH032 und Neddylierungs- und Proteasom-Inhibitoren war für die Unterscheidung zwischen VHL-abhängigen und VHL-unabhängigen Kinaseabbauprozessen unerlässlich. Das entwickelte Evaluierungsprogramm diente als Blaupause für weitere Validierungsstudien von E3-Liganden für die Entwicklung von PROTACs. Das entwickelte Arbeitsprogramm und die Ergebnisse der PROTAC Evaluierung durch quantitative Proteomik wurde von unserem Team publiziert (Miletić N und Weckesser J et al; ACS Chem Biol. 2025 Feb 21;20(2):507-521. doi: 10.1021/acscchembio. 4c00812). Die synthetischen Arbeiten sowie die biophysikalischen und zellbiologischen Interaktionsstudien wurden von der AG Knapp durchgeführt. Proteomik Experimente wurden von der AG Dikic durchgeführt.

2.2 Evaluierung der neuen E3 Liganden

Die zweite getestete E3-Ligandenfamilie rekrutierte die E3-Ligase DCAF1. Sowohl SGC als auch Novartis haben DCAF1-Liganden veröffentlicht und zwei verschiedene Liganden wurden im Rahmen des NewPRO Projekts getestet. Ein relativ schwacher DCAF-Ligand (**CYCA-117-**

113) wurde vom SGC und Cyclica publiziert (K_D etwa $3 \mu\text{M}$). Dieser DCAF1 Ligand wurde mit dem panBET-Inhibitor JQ1 fusioniert und durch unterschiedlich Linker wurden 6 PROTACs synthetisiert (Merck KGaA). Mit Hilfe von HiBiT Sensorzelllinien konnte gezeigt werden, dass einige der synthetisierten PROTACs BRD4 abbauen. Der effizienteste PROTAC JQ-C9-DC1 zeigte eine überraschend gute Abbaueffizienz für die Zielstruktur BRD4 (DC_{50} $0,27 \mu\text{M}$, D_{max} : 100%). Diese Daten zeigen, dass dieser Ligand für die Entwicklung von PROTACs, die DCAF1 adressieren, verwendet werden kann. Potentere Liganden dieser E3-Ligase wären jedoch von Vorteil um eine noch potentere Abbaueffizienz zu erreichen.

Ein größerer Target Raum wurde, wie oben beschrieben, durch Addukte mit nicht-selektiven Kinase-Inhibitoren adressiert. Für diese Studie wurde der von Novartis veröffentlichte DCAF1-Ligand verwendet. Insgesamt wurden 12 PROTACs mit verschiedenen Linkern und Kopplungspunkten an die Kinase-Inhibitoren synthetisiert (AG Knapp). Der **DCAF1** Ligand wurde von Merck KGaA bereitgestellt. Der von VHL etablierte Workflow und der Vergleich mit CRBN-basierten PROTACs (CRBN interagiert mit den gleichen Adaptorproteinen) konnte zeigen, dass DCAF1 Liganden-basierte PROTACs viele Proteinkinasen effizient abbauen, aber der Target Raum dieses Abbaus ähnlich dem von CRBN ist. Die chemische Vielfalt der bisher publizierten DCAF1 Liganden und die Abhängigkeit der Krebszellen von DCAF1 machen dieses E3 Ligandensystem sehr attraktiv für die Entwicklung selektiver PROTACs für onkologische Anwendungen. Die MS Proteomik war eine Zusammenarbeit mit Neosphere.

Das vierte. E3 Ligase Ligand System beschäftigte sich mit der E3 Ligase **TRIM24**. Die AG Knapp hatte bereits seit 2012 Liganden für die Bromodomäne von TRIM24 entwickelt, die jedoch nie in PROTACs eingesetzt wurden. Mehr als 20 putative PROTACs wurden durch Kopplung dieser TRIM24-Liganden, verschiedener Linker und der entwickelten nicht-selektiven Kinase-Inhibitoren synthetisiert (AG Knapp). Die entwickelten TRIM24 Liganden-basierten PROTACs waren zellgängig und nicht toxisch, wie durch BRET Assays gezeigt werden konnte. In MS (Massenspektroskopie) Proteomstudien wurde jedoch kein signifikanter Abbau beobachtet. Wie TRIM24 aktiviert wird ist noch nicht bekannt. Es wurde lediglich gezeigt, dass diese putative E3-Ligase bei DNA-Schäden den Transkriptionsfaktor p53 rekrutiert und abbaut. Es könnte daher sein, dass TRIM24 unter den getesteten Bedingungen keine aktive E3-Ligase ist. Für die allgemeine Entwicklung von PROTACs sind diese E3-Ligase-Systeme jedoch nicht sinnvoll. Die MS Proteomics wurde in Zusammenarbeit mit dem Küsterlabor an der Technischen Universität München durchgeführt.

Eine Serie von 20 PROTACs wurde mit Liganden der putativen E3-Ligase **AhR** (Arylhydrocarbon receptor) synthetisiert (Merck KGaA, AG Knapp). Als AhR-Liganden wurden die Liganden BAY-218 und das Indol ITE verwendet. Es wurden sowohl JQ1-Addukte als auch Addukte mit nicht-selektiven Kinase-Inhibitoren synthetisiert. In der Literatur wurden vor

unserer Studie PROTACs mit den AhR Liganden Naphthoflavon und ITE beschrieben, die Aktivitäten (BRD4) im Bereich von 20-30 μM (Western blot) hatten (Ohoka et al, ACS Chemical Biology 2019; Shoda et al Pharmaceutical 2020)). In diesen Veröffentlichungen wurden jedoch keine Kontrollen verwendet. In Luciferase Genreporter Assays (Merck KGaA) zeigte das publizierte Naphthoflavon-basierte PROTAC keine Aktivität. Die in unserem Programm synthetisierten PROTACs zeigten Aktivität im Genreporter Assays im Bereich pEC_{50} 6-5. Alle JQ1 Addukte zeigten jedoch in HiBiT Assays nur DC_{50} Werte $>20 \mu\text{M}$. Dieser vermeintliche Abbau konnte auch durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren nicht verhindert werden, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um einen über das Ubiquitin-System vermittelten Effekt handelt. Die auf Kinase-Inhibitoren basierenden PROTACs zeigten eine gute Aktivität im BRET-Assay, was auf eine gute Zellgängigkeit hinweist (AG Knapp). In MS Proteomics wurde jedoch kein spezifischer Abbau beobachtet. Diese relativ große Datenmenge deutet darauf hin, dass AhR nicht für das PROTAC Design verwendet werden sollte und daher wurde AhR als E3 Ligase de-validiert.

Für die E3-Ligase **GID4** wurden erste Liganden entwickelt (AG Knapp, SGC/Pfizer (Nat Chem Biol. 2024 Sep;20(9):1164-1175)). Um diese Liganden zu testen, wurden 5 JQ1-Addukte synthetisiert. Diese zeigten jedoch in BRET Assays nicht den gewünschten Abbau der Zielstruktur BRD4. Aufgrund von Syntheschwierigkeiten und nicht idealen Kopplungspunkten am GID4 Liganden wurde das Projekt nach diesen ersten Ergebnissen de-priorisiert (AG Knapp).

Die *in silico* Arbeiten zur Charakterisierung und Identifizierung neuer PROTACs und Molekularer Klebern erfolgte mit den Modellierungs- und Simulationsvorschriften, die im InnoTECH Projekt erarbeitet wurden (AG Hummer). So wurde die ternäre Komplexstruktur eines neuartigen Molekularen Klebers mit CRBN und BCL-2 *de novo* erarbeitet, aus diesen die bindungsrelevanten Aminosäuren GLY128, ALA131, and THR132 des BCL-2 Zielproteins bestimmt und experimentell bestätigt (AG Hummer, AG Dikic, AG Cheng (Cell Rep. Phys. Sci. 2024 Mai 15;5(5):101960)). Die Simulation und Modellierung von zwei weiteren, ternären Komplexen mit selektiven Kinase-„Degradern“ (PROTACs) wird innerhalb des Nachfolgeprojekts finalisiert und ermöglichen die Charakterisierung der selektiven PROTAC-Eigenschaften (AG Hummer, AG Knapp).

Um PROTACs mit strukturierten Linkern zu erforschen wurden als Ausgangspunkt zur Modifizierung von Polyethylenglycol-basierten Linkern zunächst zwei von uns entwickelte PROTACs in großem Maßstab hergestellt. Bei dem PROTAC für das Modellprotein FKBP12 handelt es sich um einen der aktivsten PROTAC für dieses Protein ($\text{DC}_{50} = 20\text{pM}$). Dabei wurde das von uns entdeckte [4.3.1] bicyklische Motif mit einem VHL-Liganden kombiniert. Der zweite PROTAC hatte das Protein FKBP51 zum Ziel, das ein potentieller Angriffspunkt zur

Behandlung von Depression, Fettleibigkeit oder chronische Schmerzen ist. Hierbei wurde das von uns entdeckte SAFit-Substanz-Motiv so modifiziert, dass es mit einem VHL-Liganden kombiniert werden konnte. Dabei war der Anknüpfungspunkt und die Linkerlänge essentiell für die Aktivität.

Des Weiteren wurden ersten Studien durchgeführt, um basierend auf diesen PROTACs Methylgruppen als Seitenketten in den Linken dieser PROTACs einzubauen. Dabei zeigte sich, dass der lange Linker (vier Etyhlenglycoleinheiten sowie eine 2-Acetyl-Gruppe = 18 Derivate) einen erheblichen synthetischen Aufwand bedeuten. Aus diesem Grund fokussierten sich die Arbeiten zunehmend auf PROTACs mit kürzeren Linkern. Weiterhin zeigte sich, dass Etyhlenglycoleinheiten hinsichtlich der Derivatisierungsmöglichkeiten begrenzt sind. Daher untersuchten wir auch Propylen-Einheiten als Grundgerüste für Linker

Um die Anomalie bei einer von uns entwickelten Serie an FKBP12-PROTACs aufzuklären, untersuchten wir systematisch PROTACs der Serie 5a1-5 und 6a1-5, die sich jeweils in der Linkerlänge unterscheiden. Diese waren i.d.R. hoch aktiv bzgl. der Degradation von FKBP12, mit Ausnahme der Analoga mit einer Linkerlänge 2. Die Bindung dieser Analoga an FKBP12 war jedoch exzellent, aber sie hatten als einzige eine ausgeprägte negative Kooperativität zur Ausbildung der ternären Komplexe. Den Grund dafür konnten wir durch Lösen der Struktur des FKBP12-6a2-Komplexes aufklären. Konkret konnten wir zeigen, wie sich der VHL-Liganden-Teil des PROTAC auf die Oberfläche von FKBP12 zurückfaltet und zusätzlich multiple intramolekulare Wechselwirkungen eingeht. Daher steht der VHL-Ligand nicht mehr zur Bindung an VHL zu Verfügung, was die negative Kooperativität und die schwache Degradation erklärt. Um die Aktivität des besten von uns entwickelten FKBP51-PROTACs (SelDeg51) weiter zu optimieren, führten wir systematisch Methylgruppen an allen Linkerpositionen ein. Diese Derivate waren z.T. hoch aktiv, aber nicht besser als die Ursprungssubstanz SelDeg51. Die anschließend gewonnene Kristallstruktur des ternären Komplexes erklärt dies, da der Linker im FKBP51-SelDeg51-VCB-Komplex dem Lösungsmittel exponiert war.

Neben den Arbeiten zu strukturierten Linkern unterstützen wir die anderen Arbeitspakete innerhalb von NewPRO, indem wir Halb-Liganden für potentielle neue Ligasen an FKBP12-Liganden konjugierten und anschließend deren Degradationspotential in Zellen prüften. So konnten wir dazu beitragen, die E3-Ligasen AhR und GID4 zu devalidieren, während für DCAF1-Liganden degradierende PROTACs gefunden wurden.

3. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

- Proteomics Studien an AhR und DCAF1 wurden in Zusammenarbeit mit Neosphere durchgeführt.
- Kinome-weite Selektivitätsstudien wurden in Zusammenarbeit mit der AG Küster (TUM) durchgeführt.
- Die Entwicklung der GID4-Liganden erfolgte in Zusammenarbeit mit SGC und Pfizer.
- Die PROTACs 5a1 und SelDeg51 wurden verschiedenen akademische und industriellen Kooperationspartnern für biologische Experimente und Formulierungsstudien zu Verfügung gestellt.

4. Budget

Für die oben aufgeführten Arbeiten wurde das folgende, von PROXIDRUGS finanzierte Personal eingesetzt:

Dikic: 1 Postdoc 100% über die Projektlaufzeit, Proteomics, Biochemie

Knapp: (Synthese 1 PDF, 3 Jahre), 1 PhD Student (Biochemie und Biophysik) (3 Jahre)

Hausch: Labor Hausch: PhD Student (Synthese, 3 Jahre), PhD Student (Biochemie, 7 Monate), Postdoc (Biophysik, 2 Monate)

Hummer: 1 Postdoc Stelle (30%, 3 Jahre), 1 Wissenschaftliche Hilfskraft (10 Monate)

Merck KGa: 1 Postdoc, 1 Chemielaborant

Für die oben aufgeführten Arbeiten wurden folgende, durch PROXIDRUGS finanzierte Verbrauchsmittel eingesetzt:

Dikic: Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien für Massenspektrometrie, Antikörper

Knapp: Reagenzien für die chemische Synthese von PROTACs sowie Servicekosten für die Analytik (NMR, HR-MS). Reagenzien für biochemische Arbeiten (Reinigung von rekombinanten Proteinen), biophysikalische Interaktionsstudien (SPR, ITC, DSF), sowie Verbrauchsmittel für die Zellkultur (BRET Assays).

Hausch: Reagenzien, Lösungsmittel und Affinitätsreagenzien für die chemische Synthese von PROTACs sowie Schlüssel-Bausteine und Halbligand hierfür. Reagenzien für biochemische Arbeiten (Reinigung von rekombinanten Proteinen, Antikörper, Zellkulturmedien, Plastikmaterialien).

Hummer: Schrödinger Lizenz

Merck KGa: Keine