

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: Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main - Institut für Pharmazeutische Chemie (Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie), Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt am Main
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 I: Kurzbericht (wird veröffentlicht)

Ursprüngliche Aufgabenstellung/wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn:

Zu Beginn des Projekts wurden selektive chimere „Degrader“ (PROTACs) fast ausschließlich auf der Basis von Cereblon und VHL E3 Liganden entwickelt. Die E3 Ligase Familie ist jedoch eine der größten Proteinfamilien im menschlichen Proteom. Ziel des Projektes NewPRO war es daher, neue E3 Ligase Ligand Systeme für die Entwicklung von PROTACs zu etablieren. Um eine umfassende Evaluierung zu ermöglichen, sollten zunächst nicht-selektive POI (Protein of Interest) Liganden verwendet werden. Das Projekt hat eine Open Science und eine kommerzielle Seite. Die nicht-kommerzielle Seite des Projektes soll POC (proof of concept) Studien mit öffentlich zugänglichen E3 Liganden ermöglichen, die bisher nicht oder wenig für die Etablierung von PROTACs genutzt wurden. Nach erfolgreicher Validierung sollen Linker und auch E3-Liganden optimiert und neue kommerziell nutzbare „Degrader“ entwickelt werden. Insgesamt sollten 6 E3-PROTAC Systeme untersucht und validiert bzw. de-validiert werden.

Ablauf des Vorhabens und wesentliche Ergebnisse:

Um eine Validierungspipeline für neue E3 Liganden zu etablieren, wurden zunächst Liganden der Von-Hippel-Lindau (VHL) E3 Ligase verwendet, die bereits umfangreich für die PROTAC

Entwicklung eingesetzt werden. Um eine möglichst große Anzahl von Zielstrukturen abzudecken und damit mögliche Anwendungen der verwendeten E3 Ligasen zu erschließen, wurden nicht-selektive Kinase-Inhibitoren und verschiedene Linker an VHL Liganden gekoppelt. Insgesamt wurden 12 PROTACs synthetisiert. Generelle Toxizität führte bei der Entwicklung der PROTACs oft zu widersprüchlichen Ergebnissen. Daher wurden vor der Analyse der PROTACs maximale Konzentrationen und Behandlungszeiten bestimmt. Die Zellgängigkeit der PROTACs wurde mittels BRET Assays an 3 Kinasen bestimmt. Anschließend wurden die abgebauten Zielstrukturen mittels quantitativer Proteomik identifiziert. Wie erwartet waren viele der synthetisierten PROTACs aktiv und der Vergleich dieser Aktivitätsdaten ermöglichte Einblicke in optimale Linkerlängen und Linkerbindungsstellen und identifizierte leicht abbaubare Zielstrukturen dieser großen Proteinfamilie.

Die zweite getestete E3-Ligandenfamilie rekrutiert die E3-Ligase DCAF1. Sowohl SGC als auch Novartis haben DCAF1-Liganden veröffentlicht und zwei verschiedene Liganden wurden getestet. Ein relativ schwacher DCAF-Ligand (SGC) wurde mit dem panBET-Inhibitor JQ1 fusioniert. Mit Hilfe von HiBiT Sensorzelllinien konnte gezeigt werden, dass einige der synthetisierten PROTACs BRD4 abbauen. Ein breiteres Zielspektrum wurde, wie oben beschrieben, durch Addukte mit nicht-selektiven Kinase-Inhibitoren adressiert. Der durch die 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, das Targetspektrum dieses Abbaus jedoch ähnlich dem von CRBN ist. Die chemische Vielfalt der DCAF1 Liganden und die Abhängigkeit der Krebszellen von DCAF1 machen dieses E3 Ligandensystem sehr attraktiv für die Entwicklung selektiver PROTACs für onkologische Anwendungen. Die putativen E3 Liganden der E3 Ligasen TRIM24, AhR, GID4 wurden de-validiert.

Neben experimentellen Arbeiten verfolgten wir gleichzeitig den Ansatz der Computermodellierung und Simulation ausgewählter ternärer Komplexe. Hierzu wurde auf die Arbeiten des InnoTECH Projekts aufgebaut, um insgesamt drei PROTAC Systeme und ein System mit einem Molekularen Kleber zu untersuchen. Die ternären Komplexstrukturvorschläge aus CRBN und BCL-2 Protein ermöglichten bereits die Vorhersage der bindungsrelevanten Schlüsselresiduen, die durch experimentelle Arbeiten bestätigt wurden. Dieser *in silico* Ansatz findet innerhalb des Nachfolgeprojekts weitere Anwendung und Umsetzung.

Für das FK506-bindende Protein 51 (FKBP51), einem potentiellen Wirkstoffziel für Depression, Fettleibigkeit und chronische Schmerzen, konnten wir die ersten PROTACs mit entwickeln, die deutlich effektiver waren als bisherige Wirkstoffe. Diese wurden auch genutzt,

um neue Formulierungsansätze zu erforschen. Des Weiteren nutzen wir das homologe FKBP12 als Reporter-Protein zur Charakterisierung von neuen E3-Ligase-Liganden.

Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

TU München (Küster Labor): Kino-Beads Assays für frühe POC Studien

Neosphere (München): Proteomics und Ubiquitinomics Studien