

# Szelektív MCL-1 inhibitorok felfedezése

KOTSCHY András\*

Servier Kutatóintézet Zrt., Záhony u 7., 1031 Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

A programozott sejthalál, és ennek egyik fontos formája, az apoptózis a vesélyt jelentő sejtek eltávolításának egyik fontos útvonala.<sup>1</sup> Az apoptózis elkerülése a rák kifejlődésének és a különböző terápiás kezelésekkel szembeni rezisztencia kialakulásának alapjelensége.<sup>2</sup> Az általunk vizsgált MCL-1 fehérje a BCL-2 fehérjecsald tagja, mely fehérjecsald felelős a mitokondriális apoptózis kontrolljáért. A ráksejtekben mennyiségük, különösen az MCL-1-é, gyakran emelkedett.<sup>3</sup> Több leírt, a génextpressziót vagy fehérjeszintézist általánosan gátló gyógyszerjelölt tumorsejtekre kifejtett citotoxikus hatásáért is (legalább részben) az MCL-1 fehérje szintjének csökkentése felel.<sup>4</sup>

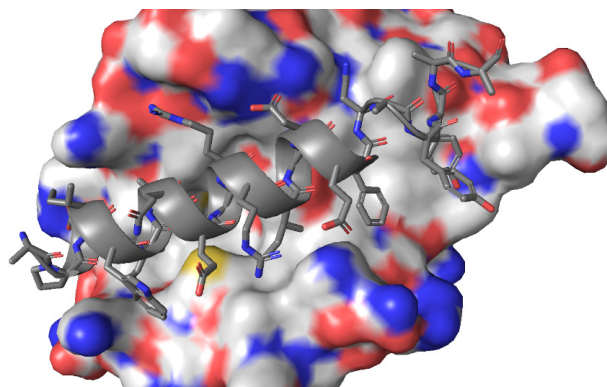
Ezen előzmények után nem meglepő, hogy a BCL-2 fehérjecsald és azon belül az MCL-1 is évtizedek óta a gyógyszerkutatók célpontjában van. A kitartó munka eredményeként a szelektív BCL-2 inhibitor venetoclax (Venclexta®) mára engedélyezett gyógyszer a CLL (krónikus limfocitás leukémia) és AML (akut mieloid leukémia) betegek gyógyításában.<sup>5</sup> Az első hatékony és szelektív MCL-1 gátlók megjelenéséig 2016-ig kellett várni. E vegyületek közül több jelenleg klinikai vizsgálati fázisban van.<sup>6</sup> Jelen közleményben az elmúlt évtizedben az MCL-1 gátlók felfedezése terén végzett kutatásainkról adunk áttekintést.

## 2. Saját eredmények

A gyógyszerkutatói program elején létre kellett hoznunk a szükséges eszköztárat, melynek segítségével a kémiai kiindulópontként szolgáló fragmenseket azonosítani tudtuk.<sup>7</sup> A folyamat következő stádiumában a fragmenseket az MCL-1-et szelektíven gátló, sejtes aktivitást mutató vezérmolekulává fejlesztettük.<sup>8</sup> Ezt a vezérmolekula optimalizálásával nyert, *in vivo* aktivitást mutató S63845 molekula azonosítása követte, mely már alkalmas volt a célpont biológiai validálására is.<sup>9</sup> A folyamat záró fázisában a további optimalás eredményeként eljutottunk az S64315 klinikai kandidátushoz, melynek humán vizsgálata jelenleg is zajlik.<sup>10</sup>

Egy gyógyszerkutatói program elindításakor nélkülözhetetlen a megfelelő reagensek előállítása és a vizsgálati módszerek kifejlesztése és validálása. A sejtekben a programozott sejthalál féken tartásáért az úgynevezett antiapoptotikus BCL-2 fehérjecsald (BCL-2, BCL-x<sub>1</sub>, MCL-1, BCL-w, BFL-1) és a sejthalált előidéző ún. BH3 fehérjék (pl. BIM, BAD, BAX, NOXA, PUMA) egyensúlya felel. E

két család elemei egymással stabil komplexeket alkotnak, így a citoszolban alacsony a szabad BH3 fehérjék szintje. Az 1. ábra az MCL-1 és BIM fehérjék komplexének röntgenszerkezetét mutatja. Gyógyszerkutatói programunk alapfeltevése az volt, hogy amennyiben egy, az MCL-1-hez erősen kötődő kismolekula segítségével ki tudjuk szorítani a BIM-et és rokonfehérjéit az MCL-1-gyel alkotott komplexeikből a ráksejtben, akkor a citoszolban feldúsuló BH3 fehérjék visszafordíthatatlanul elindítják a programozott sejthalált, ami a ráksejt pusztulásához vezet. Míg az egészséges sejtek általában a BCL-2 fehérjecsald több tagjára is támaszkodnak a belső egyensúly fenntartásában, addig a ráksejtekben jellemzően egy-egy antiapoptotikus fehérje feldúsulása biztosítja a ráksejt túlélését, így az MCL-1 függő daganatok esetében bízhattunk ezen sejtek szelektív elpusztításában.



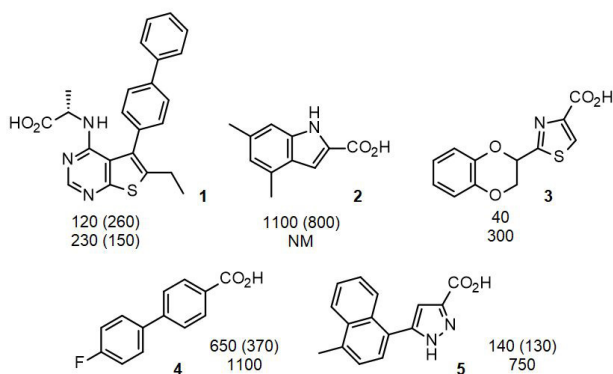
1. Ábra. Humán MCL-1 fehérje BIM komplexének röntgenszerkezet (PDB:6QF1)

A helikális elrendeződést mutató BH3 fehérjék nM affinitással kötődnek a BCL-2 család tagjaihoz. A fehérje-fehérje kölcsönhatási felület, az ún. „BH3-groove” viszonylag hidrofób, kevés erős kölcsönhatásra ad lehetőséget a kismolekula és a célfehérje között. Emiatt sokáig elképzelhetlennek tartották, hogy gyógyszer fejleszthető e megközelítéssel (ún. undruggable célpont). A kutatói folyamat elején előállítottuk a 350 aminosavból álló humán MCL-1 fehérje BH3 kötőrégióját (171-327 aminosavak), mely alkalmas volt biofizikai vizsgálatok, pl. izotermális titrálós kalorimetria (ITC) elvégzésére, és melynek a BIM-mel alkotott komplexét sikeresen kristályosítottuk (1. ábra). A BIM fehérje fluoreszcensen jelölt analogonjait felhasználva olyan fluoreszcencia polarizáció (FP) mérésen alapuló módszert dolgoztunk ki, amellyel nagy áteresztőképességgel határozhattuk meg a vegyületeink MCL-1-hez való kötődését az 1 nM – 100 μM tartományban.<sup>7</sup>

\* Tel.: +36-1-881-2000; e-mail: andras.kotschy@servier.com

## 2.1. Kiindulópontok azonosítása

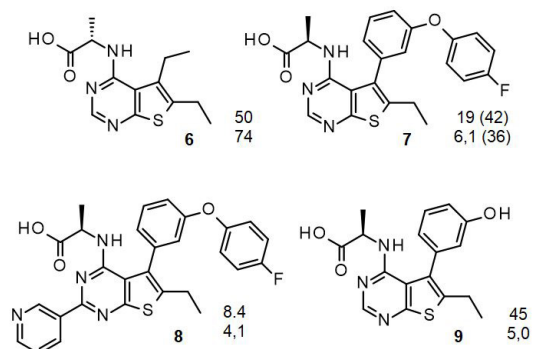
A kémiai kiindulópontok azonosítására NMR alapú fragmensszűrést használtunk, melynek során 8 fragmensből álló keverékekhez adtuk az MCL-1 fehérjét és vizsgáltuk a fragmensekre jellemző  $^1\text{H}$  NMR jelek intenzitásának változását különböző mérési módszerek (STD, water-LOGSY, CPMG) között. Annak bizonyítására, hogy egy adott fragmens a BH3 fehérje helyére köt, a méréseket elvégeztük hozzáadott NOXA fehérje jelenlétében is. Több mint 1100 fragmensből kiindulva 40 olyan vegyületet azonosítottunk, melyek több technikával vizsgálva is kötődést mutattak és a NOXA hatására megszűnt a kötődésük. Mivel a BCL-2 fehérjecsaldon belül fontos volt az MCL-1 szelektív gátlása, így a fragmensek esetében az MCL-1 mellett a BCL-2-höz való kötődésüket is vizsgáltuk FP módszerrel. A 2. ábra néhány fragmens találat szerkezetét, valamint az MCL-1 és BCL-2 kötődési értékeit mutatja be. Ezen vegyületek (1-5) közös jellemzője, hogy a  $\mu\text{M}$  tartományban kötődnek a célfehérjéhez és nem mutatnak szelektivitást a BCL-2 fehérjével szemben. Mind az öt fragmens találat karbonsav részletet tartalmaz, amely az MCL-1 fehérje egyik Arg oldalláncával képez ionos kapcsolatot. Ennek hiányában a fragmensek kötődése több nagyságrenddel gyengül. E gyengén kötődő fragmensek esetében célszerű a fehérjekötődési vizsgálatokat két különböző elven működő (ún. ortogonális) módszerrel is elvégezni. A mi esetünkben NMR HSQC titrálásokat, valamint izotermális titrálási kalorimetriát (ITC) használtunk erre a célra, melyek az elsődleges FP mérésekhez hasonló eredményt adtak.



2. Ábra. Az NMR fragmensszűréssel azonosított néhány találat szerkezete, MCL-1 (felső szám) és BCL-2 (alsó szám) kötődése FP mérésekből számított  $eK_i$  értékek  $\mu\text{M}$ -ban kifejezve, zárójelben HSQC NMR  $K_d$  értékek. NM – nem mérhető 2,5 mM koncentrációig.

Az azonosított fragmensek MCL-1 komplexeiről nem sikerült szerkezeti információt szereznünk, így a validálás során szisztematikusan változtattuk a szerkezetüket és vizsgáltuk ennek hatását az MCL-1-hez való kötődésükre. Az elsődleges eredmények alapján figyelmünk elsősorban a tieno[2,3-*d*]pirimidinvázis 1 fragmens származékaira összpontosult. Ennek az alapváznak előnye, hogy a gyűrűrendszer szénatomjaira a különböző helyettesítők beépítése általában jó hatékonysággal megoldható. Így előállítottuk többek között a kisméretű helyettesítőket hordozó 6 vegyületet, melynek affinitása hasonló volt a kiindulópontunkhoz

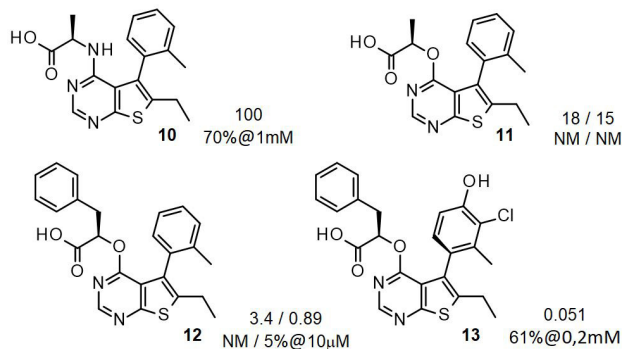
(3. Ábra). A gyűrűváz 5-ös helyzetébe difeniléter-csoportot építve (7) mind az MCL-1, mind a BCL-2 affinitás  $20 \mu\text{M}$  alá csökkent, amit az NMR  $K_d$  mérések is megerősítettek. További, hasonló mértékű javulást értünk el, amikor a pirimidinyűrű 2-es helyzetébe aromás helyettesítőt építettünk be (8). Ezek a változtatások látszólag jó irányba vezetnek, de ha figyelembe vesszük, hogy milyen mértékű mólómeget növekedést „szenvedett el” a molekulánk, akkor rögtön látszik, hogy nem hatékonyak. Jól példázta ezt a 9-es molekula is, mely jóval kisebb mérete ellenére számottevő kötődést mutat mindkét vizsgált fehérjéhez, így öt választottuk a további fragmensoptimalás kiindulópontjának. A részletesebb szerkezet-hatás összefüggést vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy ezen kisméretű vegyületek esetében többféle kötődési mód is előfordulhat, ami nehezíti az eredmények értelmezését.



3. Ábra. A tienopirimidin-vázis fragmens találat kémiai validálása. MCL-1 (felső szám) és BCL-2 (alsó szám) kötődés FP mérésekből számított  $eK_i$  értékek  $\mu\text{M}$ -ban kifejezve, zárójelben HSQC NMR  $K_d$  értékek.

## 2.2. Fragmens optimalása vezérmolekulává

A 9-es fragmens optimalásának egyik fontos része volt az 5-ös helyzetű benzolgyűrű szubsztitúciós mintázatának változtatása (4. Ábra). E folyamat során váratlan módon, a fenilcsoportot *ortho*-tolilra cserélve (10), jelentős változást értünk el a vegyület szelektivitásában. Míg az MCL-1-hez való kötődés a  $\mu\text{M}$  tartományban maradt, a BCL-2 kötődés elromlott.

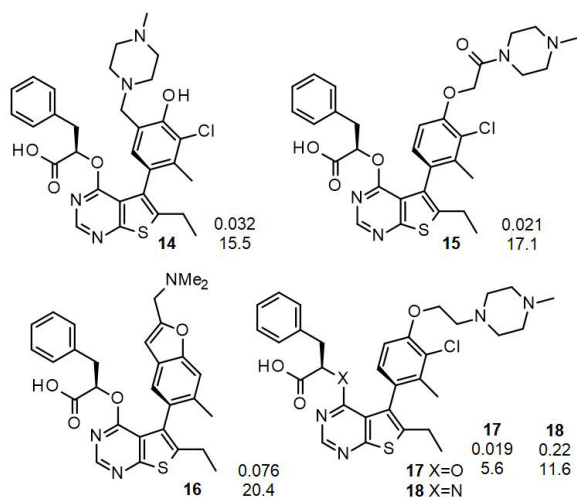


4. Ábra. A tienopirimidin-vázis fragmens optimalásának korai fázisa. MCL-1 (felső szám) és BCL-2 (alsó szám) kötődés FP mérésekből számított  $eK_i$  értékek  $\mu\text{M}$ -ban kifejezve. Részleges görbe esetén a legnagyobb koncentrációnál mért hatást tüntettük fel. NM – nem mérhető 2,5 mM koncentrációig.

Még markánsabb lett ez a hatás, amikor az aminosavat hidroxisavra cseréltük. Az *ortho*-tolil helyettesítő gátolt rotációja miatt a **11** vegyület diasztereomerek keverékékként keletkezett, melyeket kromatográfiásan el tudunk választani. Mindkét atropoizomer hasonló, 20  $\mu\text{M}$  alatti affinitást mutatott az MCL-1-hez, míg BCL-2 kötődésük nem volt mérhető.

A tejsav részlet növelésével (**12**) szintén számottevő javulást sikerült elérnünk: az MCL-1 kötődést a nM tartományba vittük, míg a szelektivitás továbbra is jelentős maradt. Hasonló, majd további hússzoros javulást értünk el a benzolgyűrű szubsztitúciós mintázatának finomhangolásával. A **13**, diasztereoiszomertiszta vegyület 51 nM kötődést mutatott az MCL-1 fehérjéhez. Ebben szerepet játszott az aromás gyűrűhöz kapcsolódó klóratom és a fehérje peptidvázának egy közeli karbonilcsoportja között kialakuló másodlagos kölcsönhatás, ún. halogénkötés is, mely a röntgenszerkezetekben jól látható.

Bár az előállított vegyületeink hatékonyan és szelektíven kötődtek az MCL-1 fehérjéhez, a sejtes vizsgálatok során nem mutatták a várt apoptózis indukáló hatást. Feltételezésünk szerint ennek elsődleges oka a gyenge sejtpenetrációs készség lehetett, amely elsősorban a karboxilcsoport fiziológiai körülmények között mutatott állandó negatív töltéséből eredhetett. Ennek ellensúlyozására különböző bázikus csoportokat építettünk be molekulánk aromás gyűrűjére (5. Ábra). A szerkezeti biológiai vizsgálatok egyértelműen mutatták, hogy ezek a csoportok az oldószerfázis felé néznek, így nem rontják el a fehérjéhez való kötődést. A **14** vegyület például 32 nM kötődést mutatott és mellette a H929 sejtvonalon vizsgálva megfigyeltük a programozott sejthalál beindítását 15,5  $\mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> értékkel.



**5. Ábra.** Az MCL-1 gátló vezérmolekula kiválasztása. MCL-1 kötődés FP mérésekből számított eKi értéke  $\mu\text{M}$ -ban kifejezve (felső szám) és H929 sejtpusztítás IC<sub>50</sub> értéke  $\mu\text{M}$ -ban kifejezve MTT módszerrel (alsó szám).

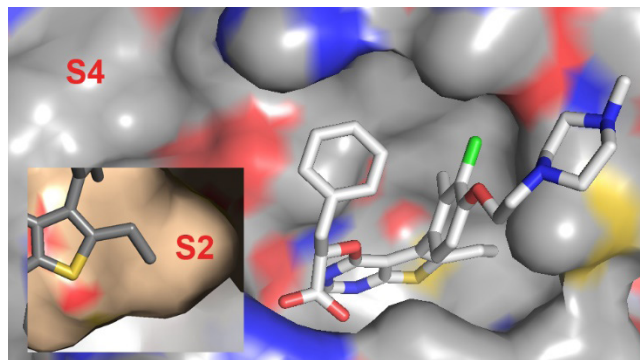
A **15** és **16** vegyületek hasonló affinitást és sejtes aktivitást mutattak, megerősítve, hogy a bázisos nitrogén jelenléte fontos, míg pontos elhelyezkedése kevésbé. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a nitrogénatom megfelelő bázis-

citása kulcsfontosságú volt a sejtes aktivitás szempontjából. Az aminocsoport változtatása általában a sejtes aktivitás gyors letöréséhez vezetett.

A legjobb affinitást és sejtes aktivitást abban az esetben értük el, amikor a bázikus csoportot etilénláncon keresztül kötöttük a fenol részlethez. A számos vizsgált amin közül az *N*-metil-piperazin részlet esetében (**17**) kiváló 19 nM kötődést és 5,6  $\mu\text{M}$  sejtes aktivitást mértünk. A vegyület diasztereoiszomerei kivétel nélkül jóval gyengébb kötődést mutattak. Elkészítettük e molekula aminosav analogonját is (**18**), amely valamivel gyengébb kötődést és aktivitást mutatott a hidroxisavnál. A **17** vegyületet részletes jellemzése (*in vitro* ADME és biztonságossági vizsgálatok, *in vivo* PK) után vezérmolekulának tekintettük és belőle kiindulva folytattuk az optimalizációs folyamatot.

### 2.3. A vezérmolekula optimalizálása és a célpont biológiai validálása

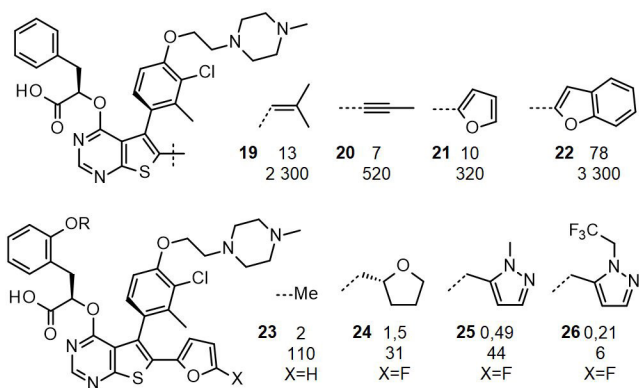
A kutatás ezen stádiumában sikerült meghatározni a **17** MCL-1-gyel alkotott komplexének röntgenkristallográfiás szerkezetét (6. Ábra). A tienopirimidin részlet a fehérje ún. S2-es kötőzsebébe mélyen benyúlik és azt szinte teljesen kitölti. E régióban az egyetlen növekedési lehetőségnek (6. Ábra kiegészítő kép) a gyűrűváz 6-os helyzetű etilcsoportjának kismértékű változtatása tűnt. Az 5-ös helyzetű tetraszubsztituált benzolgyűrű esetében nem láttuk értelmét a további átalakításoknak. A 4-es helyzetű tejsavszármazék esetében az építkezés kézenfekvő helye a fenilcsoport volt, ezen belül is a benzolgyűrű *ortho*-helyzete, mely lehetőséget kínált a fehérje távolabbi, ún. S4 kötőzsebének elérésére.



**6. Ábra.** A **17** vezérmolekula MCL-1 komplexének röntgenszerkezete (PDB:6QYO). A kiegészítő kép az S2 kötőzseb egy részletét mutatja.

A vezérmolekula optimalizálását az S2 kötőzsebbe nyúló etilcsoport változtatásával kezdtük. A szerkezeti információk alapján azt vártuk, hogy csak minimális átalakítást végzhetünk a hatóanyagunkon az MCL-1-hez való kötődés elrontása nélkül. Örömmel tapasztaltuk, hogy a telítetlen oldalláncot hordozó 2-metil-propénil- (**19**) és 1-propénil-származék (**20**) is jelentős affinitást mutatott és emellett a sejtes aktivitásuk is számottevően javult (7. Ábra). Ugyanakkor meglepő eredmény volt a nagyobb tégányú furil oldalláncot hordozó **21** vegyület 10 nM kötődése és 320 nM sejtes aktivitása. A röntgenszerkezet alapján e csoport már nem fért volna be az S2-es kötőzsebbe, ezért a

kötődés csökkenésére számítottunk. Az eredmények arra utaltak, hogy az MCL-1 fehérje számottevő konformációs mozgékonyssággal rendelkezik és képes úgy átrendeződni, hogy helyet biztosítson az öttagú heterociklusnak. A nagyobb térigényű kétyűrűs benzofuril-csoportot is beépítettük a tienopirimidin 6-os helyzetébe (**22**). Bár a kötődés számottevő maradt, de a furánanalogonhoz képest elromlott, ami arra utalt, hogy elértük a fehérje kötőzsebe befogadóképességének határát.



**7. Ábra.** Az MCL-1 gátló vezérmolekula optimalása az S2 és S4 kötőzsebben. A vegyületek MCL-1 kötődésének FP (**19-23**) és QA (**24-26**) mérésekből számított  $eK_1$  értéke nM-ban kifejezve (felső szám) és H929 sejtpusztítás MTT módszerrel mért  $IC_{50}$  értéke nM-ban kifejezve (alsó szám).

A 6-os helyzetű furángyűrűt rögzítve belefogtunk a tejsav fenilcsoportjának változtatásába. Egyszerű metoxicsoprotot beépítve (**23**) a sejtes aktivitást sikerült 110 nM-ra javítanunk, míg az MCL-1 kötődés elérte a vizsgálati módszerünk alsó határának számító 1-2 nM tartományt, ezért a továbbiakban egy új, ún. „quench assay-t” (QA) vezetünk be, melynek alsó mérési határa az alacsony pikomólos tartományban volt. Hasonló további előrelépést, 1,5 nM kötődést és ezzel együtt 31 nM aktivitást hozott a tetrahydrofuranil-metil helyettesítő és a furilcsoport 5-ös helyzetébe egy fluoratom egyidejű beépítése (**24**).

Hasonló *in vitro* tulajdonságokkal rendelkezett a pirazolil-metil-csoportot hordozó **25** vegyület is (7. Ábra). E vegyületet mutatott sajátosságai miatt *in vivo* vizsgálatoknak is alávetettük. Mivel farmakokinetikai sajátosságai alapján megfelelő expozícióra számíthatunk intravénás adagolás esetén, így az MCL-1 gátlásra érzékeny AMO1 ráksejtvonalat egérbe ültettük (xenograft) és az egereket **25** oldatával kezeltük. A hatóanyag adagolása után adott idővel a daganatos sejteket vizsgálva megállapítottuk, hogy dózisfüggő mértékben sikerült apoptózis indukciót kiváltanunk, amelyet a folyamatra jellemző PARP hasítás mértékével jellemeztünk (1. Táblázat). Mivel 25 mg/kg dózisban adva még 16 óra elteltével is jelentős farmakodinámiás (PD) jelet mértünk, így megvizsgáltuk azt is, hogy a **25** vegyületet 5 egymást követő napon (QD5) ebben a dózisban adagolva hogyan változik az egérbe ültetett daganat mérete (1. Táblázat). A kezelés alatt tumor regressziót észleltünk és a kezelés leállítását követően 3 hétig tartott mire az újra növekedő daganatok mérete elérte a határként kijelölt 500 mm<sup>3</sup>-t.

A szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy **25** pirazolrészletének nitrogénatomja kiválóan alkalmas a vegyület további növelésére és ennek szisztematikus változtatásával jutottunk a **26**-os vegyülethez, amely S63845 jelöléssel került leírásra. **26** affinitásában érdemi előrelépést észleltünk és sejtes aktivitása is kiemelkedő volt ( $IC_{50}$ =6 nM). A farmakodinámiás vizsgálatok azt mutatták, hogy **26** 12,5 mg/kg-os dózisban is tartós apoptózis indukciót váltott ki és hatékonyan gátolta a daganat növekedését is ebben a dózisban (1. Táblázat). E vegyület biológiai aktivitása lehetővé tette, hogy az MCL-1 gátlás biztonságosságával kapcsolatos vitás kérdésekre is választ kapjunk. Az MCL-1 fehérjét nélkülöző (ún. knock-out, vagy KO) genetikusan módosított egerek ugyanis káros szervi elváltozásokat mutattak és kérdéses volt, hogy ezek az MCL-1 biológiai funkciójából (programozott sejthalál szabályozása), vagy esetleg más szerepéből eredtek (pl. fehérjekomplexekben betöltött szerkezet összetartó funkció). MCL-1 függő rákot hordozó egér betegségmodellben sikerült **26** adagolásával az állatok jelentős részét tartósan meggyógyítani, miközben az állat egyéb szerveiben nem észleltünk káros elváltozást.<sup>9</sup> Ezen eredményekből bizalmat merítve léptünk be az optimálási folyamat záró stádiumába.

**1. Táblázat.** Farmakodinámiás aktivitás 12,5 mg/kg dózisban, i.v. bólus adagolás után 16 óra elteltével (n=3) és tumornövekedés-gátlás AMO1 egér xenograft modelben QD5 i.v. bólus adagolással (n=8).

	PD válasz	dózis (mg/kg)	%TGI (nap)	%TGI max (nap)	Relapszus <sup>a</sup>
<b>25</b>	55 <sup>b</sup>	25	120,5 (7)	147,5 (2)	23
<b>26</b>	309	12,5	118,9 (7)	152,8 (2)	32
<b>28</b>	129	12,5	120 (7)	134,6 (4)	28
<b>30</b>	237	6,25	106 (7)	132,4 (2)	14
<b>31</b>	285	6,25	189,5 (4)	189,5 (4)	38
<b>32</b>	60	6,25	121,2 (4)	130,8 (2)	21

<sup>a</sup> A kezelés után eltelt idő, mikorra a csoport medián tumormérete eléri az 500 mm<sup>3</sup>-t.

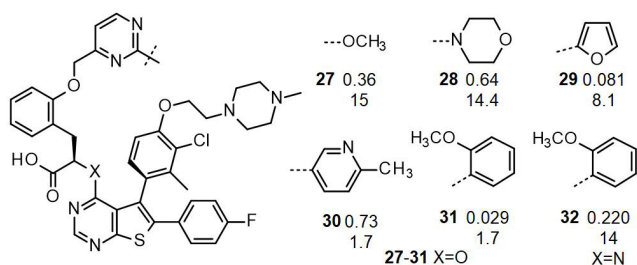
<sup>b</sup> 25 mg/kg dózisban adagolva.

## 2.4. A klinikai gyógyszerjelölt kiválasztása

Bár **26** kiemelkedő affinitással és szelektivitással kötődött az MCL-1 fehérjéhez, és ezen keresztül sejthalált indukált mind *in vitro*, mind *in vivo* betegség modellekben, a fluorfuril-csoport jelenlétéből eredő fényérzékenysége miatt nem léphetett tovább a kutatás-fejlesztési folyamatban. A fényérzékenység kiküszöbölésére a hasonló szerkezetű 4-fluorfenil helyettesítő beépítése jelentett megoldást. A késsői vezérmolekula-optimalás a **27** metoxi-pirimidin-származékból indult (8. Ábra). Ez a vegyület 360 pM affinitás mellett 15 nM sejtes aktivitást mutatott. A metoxicsoprot morfolinra való cseréje (**28**) bár kissé csökkentette az affinitást, de megőrizte a sejtes aktivitást. Amennyiben **28**-at a farmakodinámiás modellben vizsgáltuk, számottevő biológiai választ észleltünk (1. Táblázat). Örömmel láttuk, hogy

a tumoros egereket kezelve tartós tumorregressziót értünk el és a kezelés befejezése után 24 nappal érte csak el a tumorok átlagos mérete az 500 mm<sup>3</sup>-t.

A pirimidinyűrű helyettesítője az S4-es kötőzsebben foglal helyet, amely viszonylag kevés kölcsönhatási pontot kínál. A poláris alifás csoportokat a heteroaromás 2-furil-csoportra cserélve (**29**) mégis számottevő affinitásnövekedés (81 pM) értünk el, ami a sejtes aktivitás javulásában is megmutatkozott. Érdekes változást hozott a 4-metil-3-piridil helyettesítő beépítése. Bár a **30**-as vegyület affinitása 730 pM-ra nőtt, sejtes aktivitása ugyanakkor 1,7 nM-ra csökkent. A két érték eltérő irányú változásáért feltehetően a megjavult sejtbejutási képesség felel. Az *in vivo* vizsgálat során **30** kiemelkedő farmakodinámiás aktivitást mutatott: a PARP fehérje hasított formájának mennyisége 16 óra elteltével 237-szeresére nőtt (1. Táblázat), amely az eddig mért legmagasabb érték. A kiváló PD válasz előrevetítette a vegyület tumornövekedés gátló hatását is. QD5 adagolást követően a korábbiakhoz képest csökkentett, 6,25 mg/kg dózisban adagolva is értékelhető regressziót értünk el és a daganatok ismételt növekedését is sikerült késleltetni.



**8. Ábra.** Az MCL-1 gátló vezérmolekula optimalizálásának záró szakasza. A vegyületek MCL-1 kötődésének QA mérésekből számított eK<sub>1</sub> értéke nM-ban kifejezve (felső szám) és H929 sejtpusztítás MTT módszerrel mért IC<sub>50</sub> értéke nM-ban kifejezve (alsó szám).

Számos további helyettesítőt is megvizsgálva a legjobb eredményt a **31**, 2-metoxifenil-csoporttal módosított vegyülettel értük el. Az S64315 néven preklinikai fejlesztésre kiválasztott vegyület 29 pM affinitást mutatott az MCL-1 fehérjéhez és 1,7 nM sejtes aktivitása is kiváló. Jó farmakokinetikai sajátságai miatt az *in vivo* PARP hasítási vizsgálatokban (PD) is kiválóan szerepelt és a tumornövekedés gátlása terén is a legjobb volt: a kezelés végére szinte teljesen eltűntek a tumorok a vizsgálati egerekből és a visszanyerésüket a kezelések befejezése után sikerült egy hónappal késleltetni (1. Táblázat). A vegyületet egyéb, itt nem részletezett tulajdonságai is alkalmassá tették a fejlesztésre,<sup>10</sup> ami a jelenleg is folyó klinikai vizsgálatokban teljesedett ki. Előállítottuk a preklinikai kandidátus aminosav analogonját is. A **32** vegyület 220 pM affinitása és 14 nM sejtes aktivitása is némiképp elmaradt **31**-től. Bár **32** az *in vivo* farmakodinámiás és tumornövekedés gátlás vizsgálatokban is értékelhető aktivitást mutatott, ez jelentősen elmaradt a hidroxisav analogontól.

### 3. Összefoglalás

NMR alapú szűrés segítségével több olyan fragmenst sikerült azonosítanunk, melyek kötődést mutattak az MCL-1 fehérje BH3 kötőrégiójához. Ezek a fragmensek, melyek kötődését ortogonális módszerek is igazolták, általában a fehérjecsalád több tagjához is kötődtek. A fragmens találatok szisztematikus kémiai változtatását követően a tieno[2,3-*d*] pirimidin alapvázat tartalmazó sorozatot választottuk ki további optimalásra. Ennek során áttörést hozott a felismerés, hogy az alapváz 5-ös helyzetébe orto-helyettesítőt hordozó aromás gyűrűt építve kiváló szelektivitást érhetünk el a fehérjecsaládon belül az MCL-1 fehérje gátlásában. Ez a kémiai változtatás egy újabb kiralitáselem megjelenését eredményezte. Az atropoizomerek kromatográfiásan elválaszthatóak voltak és megfelelő stabilitást mutattak a vizsgálati körülmények között. A helyettesítők további finomhangolásával és egy bázikus nitrogén beépítésével sikerült sejtes aktivitást mutató vezérmolekuláig jutnunk.

A vezérmolekula optimalizálását szerkezeti biológiai információ is segítette. Ennek során megfigyeltük, hogy az MCL-1 fehérje képes volt olyan molekulákkal is erős kölcsönhatást kialakítani, amelyek a rendelkezésre álló szerkezeti adatok alapján nem fértek volna el a kötőzsebben. A további kémiai változtatások eredményeként sikerült a kötődést és a sejtes aktivitást is olyan mértékben javítanunk, hogy a vegyületeink *in vivo* modellekben is képesek voltak beindítani a programozott sejtthalált. A kutatási program ezen stádiumában, hála a rendelkezésre álló vegyületek hatékonyságának, megnyugtató választ tudtunk adni az MCL-1 fehérje gátlásának biztonságosságával kapcsolatos felvetésekre is. A vezérmolekula további finomhangolásával S64315-höz jutottunk, amit előnyös tulajdonságai miatt kiválasztottunk preklinikai fejlesztésre. A vegyület jelenleg klinikai vizsgálati fázisban van S64315/MIK665 kódneven.

### Köszönetnyilvánítás

A fenti eredmények egy többrésztvevős nemzetközi kutatás során születtek. Ezúton köszönöm az összes szabadalmi bejelentés és közlemény társszerzőinek lelkiismeretes munkájukat az elmúlt évtizedben, valamint a Servier Kutatóintézet kollektívájának, és azon belül is kiemelten az Analitikai Kémiai Divízió munkatársainak folyamatos és magas szintű támogatását!

## Hivatkozások

1. Green, D. R.; Llambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbour Perspect. Biol.* **2015**, *7*, 1-24.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
3. Beroukhi, R.; Mermel, C. H.; Porter, D.; Guo Wei, Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J. S.; Dobson, J.; Urashima, M.; McHenry, K. T.; Pinchback, R. M.; Ligon, A. H.; Cho, Y.-J.; Haery, L.; Greulich, H.; Reich, M.; Winckler, W.; Lawrence, M. S.; Weir, B. A.; Tanaka, K. E.; Chiang, D. Y.; Bass, A. J.; Loo, A.; Hoffman, C.; Prensner, J.; Liefeld, T.; Gao, Q.; Yecies, D.; Signoretti, S.; Maher, E.; Kaye, F. J.; Sasaki, H.; Tepper, J. E.; Fletcher, J. A.; Taberero, J.; Baselga, J.; Tsao, M.-S.; Demicheli, F.; Rubin, M. A.; Janne, P. A.; Daly, M. J.; Nucera, C.; Levine, R. L.; Ebert, B. L.; Gabriel, S.; Rustgi, A. K.; Antonescu, C. R.; Ladanyi, M.; Letai, A.; Garraway, L. A.; Loda, M.; Beer, D. G.; True, L. D.; Okamoto, A.; Pomeroy, S. L.; Singer, S.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Getz, G.; Sellers, W. R.; Meyerson, M. *Nature* **2010**, *463*, 899-905.  
<https://doi.org/10.1038/nature08822>
4. a) Wei, G.; Margolin, A. A.; Haery, L.; Brown, E.; Cucolo, L.; Julian, B.; Shehata, S.; Kung, A. L.; Beroukhi, R.; Golub, T. R. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 547-562.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.028>  
b) Barlaam, B.; De Savi, C.; Drew, L.; Ferguson, A.; Ferguson, D.; Gu, C.; Hawkins, J. W.; Hird, A.; Lamb, M.; O'Connell, N.; Pike, K.; Proia, T.; San Martin, M.; Vasbinder, M.; Varnes, J.; Wang, J.; Shao, W. *Cancer Research*, **2018**, *78*, 1650-1650.  
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-1650>
5. Juin, P.; Geneste, O.; Gautier, F.; Depil, S. & Campone, M. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 455-465.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3538>
6. a) Caenepeel, S.; Brown, S. P.; Belmontes, B.; Moody, G.; Keegan, K. S.; Chui, D.; Whittington, D. A.; Huang, X.; Poppe, L.; Cheng, A. C.; Cardozo, M.; Houze, J.; Li, Y.; Lucas, B.; Paras, N. A.; Wang, X.; Taygerly, J. P.; Vimolratana, M.; Zancanella, M.; Zhu, L.; Cajulis, E.; Osgood, T.; Sun, J.; Damon, L.; Egan, R. K.; Greninger, P.; McClanaghan, J. D.; Gong, J.; Moujalled, D.; Pomilio, G.; Beltran, P.; Benes, C. H.; Roberts, A. W.; Huang, D. C.; Wei, A.; Canon, J.; Coxon, A.; Hughes, P. E. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1582-1597.  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0387>  
b) Tron, A.E.; Belmonte, M.A.; Adam, A.; Aquila, B.M.; Boise, L.H.; Chiarparin, E.; Cidado, J.; Embrey, K.J.; Gangl, E.; Gibbons, F.D.; Gregory, G.P.; Hargreaves, D.; Hendricks, J.A.; Johannes, J.W.; Johnstone, R.W.; Kazmirski, S.L.; Kettle, J.G.; Lamb, M.L.; Matulis, S.M.; Nooka, A.K.; Packer, M.J.; Peng, B.; Rawlins, P.B.; Robbins, D.W.; Schuller, A.G.; Su, N.; Yang, W.Z.; Ye, Q.; Zheng, X.L.; Secrist, J.P.; Clark, E.A.; Wilson, D.M.; Fawell, S.E.; Hird, A.W. *Nature Comm.* **2018**, *9*, 5341.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>
- c) Shaw, S.; Bian, Z.; Zhao, B.; Tarr, J. C.; Veerasamy, N.; Ok, K.; Johannes Belmar, L.; Arnold, A. L.; Fogarty, S. A.; Perry, E.; Sensintaffar, J. L.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2410-2421.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01155>
- d) Bruncko, M.; Wang, L.; Sheppard, G. S.; Phillips, D. C.; Tahir, S. K.; Xue, J.; Erickson, S.; Fidanze, S.; Fry, E.; Hasvold, L.; Jenkins, G. J.; Jin, S.; Judge, R. A.; Kovar, P. J.; Madar, D.; Nimmer, P.; Park, C.; Petros, A. M.; Rosenberg, S. H.; Smith, M. L.; Song, X.; Sun, C.; Tao, Z.-F.; Wang, X.; Xiao, Y.; Zhang, H.; Tse, C.; Levenson, J. D.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2180-2194.  
<https://doi.org/10.1021/jm501258m>
7. Murray, J.; Davidson, J.; Chen, I.; Dokurno, P.; Davis, B.; Harris, R.; Jordan, A.; Matassova, N.; Pedder, C.; Ray, S.; Roughley, S.; Smith, J.; Walmsley, C.; Wang, Y.; Whitehead, N.; Williamson, D.; Casara, P.; Le Diguarher, T.; Hickman, J.; Stark, J.; Kotschy, A.; Geneste, O.; Hubbard, R.E. *ACS Omega* **2019**, *4*, 8892-8906.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00611>
8. Szlavik, Z.; Ondi, L.; Csékei, M.; Paczal, A.; Szabó, Z.B.; Radics, G.; Murray, J.; Davidson, J.; Chen, I.; Davis, B.; Hubbard, R.E.; Pedder, C.; Dokurno, P.; Surgenor, A.; Smith, J.; Robertson, A.; LeToumelin-Braizat, G.; Cauquil, N.; Zarka, M.; Demarles, D.; Perron-Sierra, F.; Geneste, O.; Kotschy, A. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6913-6924.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00134>
9. Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G. L.; Gong, J.; Moujalled, D. M.; Bruno, A.; Csekei, M.; Paczal, A.; Szable, Z. B.; Sipos, S.; Radics, G.; Prosenyak, A.; Balint, B.; Ondi, L.; Blasko, G.; Robertson, A.; Surgenor, A.; Dokurno, P.; Chen, I.; Matassova, N.; Smith, J.; Pedder, C.; Graham, C.; Studeny, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A.; Gravé, F.; Segal, D.; Riffkin, C. D.; Pomilio, G.; Galbraith, L. C. A.; Aubrey, B. J.; Brennan, M. S.; Herold, M. J.; Chang, C.; Guasconi, G.; Cauquil, N.; Melchiorre, F.; Guigal-Stephan, N.; Lockhart, B.; Colland, F.; Hickman, J. A.; Roberts, A. W.; Huang, D. C. S.; Wei, A. H.; Strasser, A.; Lessene, G.; Geneste, O. *Nature* **2016**, *538*, 477-482.  
<https://doi.org/10.1038/nature19830>
10. Szlavik, Z.; Csékei, M.; Paczal, A.; Szabó, Z.B.; Sipos, S.; Radics, G.; Prosenyak, A.; Balint, B.; Murray, J.; Davidson, J.; Chen, I.; Dokurno, P.; Surgenor, A. E.; Daniels, Z. M.; Hubbard, R.E.; Le Toumelin-Braizat, G.; Claperon, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A.-M.; Bruno, A.; Chanrion, M.; Colland, F.; Maragno, A.-L.; Demarles, D.; Geneste, O.; Kotschy, A. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 13762-13795.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01234>

## The discovery of selective MCL-1 inhibitors

Apoptosis, an evolutionary highly conserved form of programmed cell death, is an essential process for the elimination of no longer needed and dangerous cells. Myeloid cell leukemia 1 (MCL-1), whose upregulation in human cancers is associated with high tumor grade, poor survival, and resistance to chemotherapy, an antiapoptotic member of the BCL-2 family of proteins, has emerged as an attractive target for cancer therapy. The longstanding interest in MCL-1 as a target and the late emergence of MCL-1 targeting drug candidates suggest that drugging MCL-1 is highly desirable but also very challenging.

Our objective was to develop a potent and selective inhibitor of MCL-1, which would restore the programmed cell death in cancer cells leading to their death, while sparing non-cancer cells. To identify the chemistry starting points we ran an NMR-based fragment screen using the BH3 protein fragment as a control to ensure that we select only fragments that bind to the appropriate region of MCL-1. As a counter screen we also routinely assessed binding to some closely related proteins like BCL-2 or BCL-x<sub>L</sub>. Systematic chemical modification of the identified hits led to the emergence of the thieno[2,3-*d*]pyrimidines (**1**) as the validated hit series.

The exploration of the different vectors around this fragment was well tolerated and we obtained several compounds showing low micromolar affinity for MCL-1, although they also had similar affinity for BCL-2. Unfortunately, at this stage of the project we had only limited structural information and some of the SAR suggested the presence of multiple binding modes, which complicated the analysis of the obtained data and its use for planning. A major breakthrough was achieved when we prepared the first 5-phenyl analog with a hindered rotation around the biaryl axis (**10**). The atropoisomers were separated and found stable under assay conditions. This structural feature led to an increased affinity for MCL-1 and reversely a decreased affinity for the other BCL-2 family members resulting in an excellent selectivity. Finetuning the substitution pattern of the benzene ring and moving to a phenyl lactic acid substituent in position 4 led to high affinity (51 nM, **13**).

Another significant advancement was the identification of amine substituents whose addition improved the cell penetrance of our compounds and led to cell killing in an MCL-1 sensitive model. Optimization of the basic group resulted in our lead compound **17**, a highly potent and selective MCL-1 inhibitor inducing apoptosis and cell killing in the micromolar range. We assessed the amino acid analog of our lead and found it slightly less potent, while the

stereoisomers of **17** all showed a significant drop of affinity, which made them useful negative controls in biological studies.

We pursued the structure-guided optimization of our lead molecule into two separate directions: making minor changes to the ethyl group in the 6-position, and a more ambitious growing of the lactic acid towards the S4 pocket. In spite of the fact that the X-ray structure of the **17**:MCL-1 complex (PDB:6QYO) showed only a little room around the ethyl group, we found that the introduction of monocyclic and bicyclic aromatic compounds was well tolerated, the former giving the more potent compounds, such as **21**. This is a clear indication of the conformational flexibility of the protein in this region.

Fixing the 2-furyl substitution in the 6-position we continued with the optimization of the lactic acid part. Of the substituents tested the pyrazolylmethyl derivatives showed consistently high affinity at or below the single digit nanomolar range, and the cellular activities also dropped below 50 nM. These compounds (e.g. **25**) were potent enough to induce apoptosis in a xenografted mice disease model (AMO1), evidenced both by the appearance of the apoptosis hallmarks such as Caspase-3 and PARP cleavage, and by the induction of tumor regression following i.v. bolus treatment on 5 consecutive days. The most active compound in this series **26** (a.k.a. S63845) was potent enough to address also some of the biological concerns related to the inhibition of MCL-1.

Some of the unfavorable properties of the furyl-substituted MCL-1 inhibitors prompted us to move away from this substituent to the 4-fluorophenyl group. The optimal bridging motif towards the S4 pocket in this subseries was the 4-pyrimidylmethyl (**27-32**).

The introduction of a diverse set of substituents onto the pyrimidine ring was well tolerated resulting in compounds with high affinity (below 1 nM) and good cellular activity (IC<sub>50</sub>s in the 1.7-15 nM range). The potency of the compounds was successfully translated into the *in vivo* setting leading to a strong pharmacodynamic response and subsequently to tumor regression. The relative efficiency of the different compounds was assessed by comparing their tumor growth inhibition as well as the time it took for the tumors to regrow following the last treatment. The most active compounds were characterized in more detail and **31** emerged as our candidate for preclinical development. This compound (a.k.a. S64315/MIK665) was later progressed into clinical development.