

Innovative Strategien zur Entwicklung von KRAS^{G12C}- und
KRAS^{G13C}-Inhibitoren: Vom *Screening* zum rationalen
Wirkstoffdesign

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

vorgelegt von

Tonia Kirschner

im Januar 2025 in Dortmund

DISSERTATION

Innovative Strategien zur Entwicklung von KRAS^{G12C}- und KRAS^{G13C}-Inhibitoren: Vom *Screening* zum rationalen Wirkstoffdesign

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DORTMUND

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

2. Gutachter: PD Dr. Leif Dehmelt

Tag der Abgabe: Dortmund, 10. Januar 2025

Tag der Disputation: Dortmund, 27. März 2025

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2021 bis Dezember 2024 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich für Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND angefertigt.

Im Rahmen der dieser Arbeit sind die Bachelorarbeiten von Vincent Wagner (Sommersemester 2023) und Erja Schube (Sommersemester 2024) entstanden; entsprechende Stellen wurden in dieser Dissertation gekennzeichnet.

Publikationen

Im Zeitraum dieses Promotionsverfahrens entstanden die folgenden Publikationen

[1] Kirschner, T.; Rodriguez, J.; Moreira, E. G.; Niggenaber, J.; Warmuth, J. D.; Verli, H.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting KRAS^{G13C} with cyclic linker-based inhibitors to explore warhead orientation. *Scientific Reports* **2025**, 15, 38213.

[2] Kirschner, T.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting KRAS Diversity: Covalent Modulation of G12X and Beyond in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, 67, 6044-6051.

[3] Goebel, L.; Kirschner, T.; Koska, S.; Rai, A.; Janning, P.; Maffini, S.; Vatheuer, H.; Czodrowski, P.; Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting oncogenic KRasG13C with nucleotide-based covalent inhibitors. *eLife* **2023**, 12, e82184.

[4] Quambusch, L.*; Depta, L.*; Landel, I.; Lubeck, M.; Kirschner, T.; Nabert, J.; Uhlenbrock, N.; Weisner, J.; Kostka, M.; Levy, L. M.; Schultz-Fademrecht, C.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Müller, M. P.; Siveke, J. T.; Rauh, D. Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of Akt inhibitors. *Nature Communications* **2021**, 12, 5297.

Danksagung

Ich möchte zuallererst meinen aufrichtigen Dank an Prof. Dr. Daniel Rauh aussprechen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Seine kontinuierliche Unterstützung und konstruktiven Ratschläge waren von großem Wert.

Ebenso möchte ich Dr. Leif Dehmelt für die freundliche Übernahme des Ko-Referats danken.

Mein großer Dank gilt Dr. Matthias Müller für seine große fachliche und mentale Unterstützung während meiner gesamten Promotion und der Betreuung meiner Arbeit, was maßgeblich zum Gelingen der Projekte beigetragen hat. Ich habe eine Menge von Dir lernen können.

Der gesamten AG Rauh danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie den fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen. Ich danke Martina Reibner, Maria Sergani, Petra Ahlhorn, Alicia Wachholz und Ulrich Schoppe für die tatkräftige administrative Unterstützung. Andreas Arndt danke ich herzlich für die Unterstützung im Labor und der Expression und Reinigung der KRAS-Konstrukte. Dr. Lisa Goebel danke ich für die Einführung und initiale Unterstützung in das Projekt. Dr. Janina Niggenaber und Jan Niklas Wiese danke ich für die Hilfe bei den Kristallisationsexperimenten und Leon-Heinrich Haurert und Maria Beerbaum für die Unterstützung bei den Synthesen. Ich bedanke mich bei der zentralen NMR- und MS-Einrichtung und besonders bei Dr. Petra Janning für die Auswertung sowie Hilfestellungen bei den MS/MS-Experimenten.

Des Weiteren möchte ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Hugo Verli, Prof. Dr. Nir London und Dr. Thomas Mühlberg sowie ihren Teams meinen Dank aussprechen, die unsere Projekte ungemein bereichert haben.

Ich hatte das Privileg, sehr talentierte und motivierte Studenten:innen zu betreuen und möchte mich bei Caroline Dunn, Vincent Wagner und Erja Schube für ihren wertvollen Beitrag zu meiner Arbeit bedanken.

In particular, I wish to express my gratitude to Dr. Sven Brandherm, Dr. Jonas Warmuth, Danilo D'Angelo, Tom Schulz, Dr. Mike Bührmann, Alexandros Pervanidis, Giorgia Mancino, Dr. Suzanne Willems, Adina Wagner, and Dr. Lena Quambusch. Over the past few years, you have not only been colleagues but also true friends to me.

Für die schöne Studienzeit möchte ich mich bei Pia Jasmin Bodenbinder, Dr. Melissa Lubeck, Dr. Leonie Fleige und Johanna Keil bedanken. Ich bin so froh, Euch immer an meiner Seite zu wissen.

Für die bedingungslose Unterstützung und die Möglichkeit meinen Weg so gehen zu können, möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meinen Eltern und Großeltern, sowie meiner gesamten Familie bedanken. Danke Tobi, dass Du mich immer begleitet hast und mir sowohl fachlich als auch mental immer zur Seite gestanden hast.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	iii
Danksagung	iv
Abkürzungsverzeichnis	ix
Kurzfassung	xiv
Abstract.....	xvi
Einleitung.....	1
Präzisionsmedizin	2
Die kleine GTPase RAS	3
Struktur und Funktion	3
Signalweiterleitung über RAS-Proteine	5
Zielgerichtete Adressierung von KRAS.....	8
Herausforderungen und Chancen der Adressierung von onkogenen KRAS Varianten.....	17
Motivation und Zielsetzung	19
Ergebnisse.....	22
Entwicklung von neuen KRAS ^{G12C} Inhibitoren mit Hilfe eines Fragment-basierten Ansatzes	22
Durchmusterung zur Identifikation von <i>Hit</i> -Molekülen	23
<i>Hit</i> -Validierung mittels der <i>CovClick</i> -Methode.....	26
Re-Synthese der <i>Hit</i> -Moleküle.....	31
Massenspektrometrische Untersuchungen	32
Zelluläre Charakterisierung der neuen Substanzbibliothek	34
Proteinkristallisation.....	38
Zusammenfassung und Ausblick	42
Entwicklung von neuartigen Nukleotid-basierten Inhibitoren für die onkogene KRAS ^{G13C} -Variante	44
Design und Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek.....	47
MS-basierte Charakterisierung der neuartigen GDP-basierten Verbindungen.....	51
GEF-katalysierter Nukleotid-Austausch.....	57
GST-Pulldown Assay	59
Strukturelle Analyse des neuartigen Liganden im Komplex mit KRAS ^{G13C}	61
Probenvorbereitung für die Kristallisationsexperimente	61
Strukturanalyse der neu generierten Verbindung 15b	66
Zusammenfassung und Ausblick	68
Kovalente Adressierung von KRAS ^{G13C} mit niedermolekularen Verbindungen.....	70

Design und <i>Docking</i> -Studien der neuartigen KRAS ^{G13C} Inhibitoren.....	71
Synthetische Darstellung der neuartigen KRAS ^{G13C} Inhibitoren	74
Massenspektrometrische Untersuchungen	84
GST Pulldown Experiment.....	86
Zelluläre Studien.....	87
Proteinkristallisation	94
Zusammenfassung und Ausblick	102
Evaluierung von Sonden-Molekülen für die Proteinkinase AKT2	104
Einleitung.....	104
Ergebnisse	107
Zusammenfassung und Ausblick	114
Zusammenfassung und Ausblick.....	115
Experimenteller Teil	121
Material und Methoden.....	121
Allgemeine Anmerkungen.....	121
Geräte.....	121
Verbrauchsmaterialien.....	122
Medien, Proteine und Reagenzien.....	125
Proteinisolation und -Reinigung.....	126
Proteinkristallisation	126
Probenvorbereitung	126
Proteinauftrennung über SDS PAGE	126
Kristallisations- <i>Screening</i>	127
Additiv- <i>Screening</i>	127
Kristallisations- <i>Fine-Screening</i>	128
Röntgenanalyse.....	128
Biochemische und biophysikalische Methoden.....	129
Kovalente Proteinmodifikation und ESI-MS-Analyse	129
Kompetitionsassay	129
SOS-katalysierter Nukleotid-Austausch	130
<i>On-Bead</i> Verdau für MS/MS-Analysen.....	130
<i>CovClick</i> -Assay	130
Pulldown-basierte Experimente.....	132
Zellbiologische Methoden.....	134
Verwendete Zelllinien	134
Verwendete Antikörper	135

Zellkultivierung von Säugerzellen.....	135
Inkulturnahme von Säugerzellen.....	136
Kryokonservierung von Säugerzellen	136
CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay.....	137
Zellzahlbestimmung.....	137
Viabilitäts-Assay (CTG).....	137
Viabilitäts-Assay (SBR)	138
Generierung von Zell-Lysaten.....	138
Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay.....	139
Western Blotting.....	139
<i>Docking</i> -Studien	141
Organische Synthesen	142
Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Entwicklung von neuen KRAS ^{G12C} Inhibitoren mit Hilfe eines Fragment-basierten Ansatzes“	144
Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Entwicklung von neuartigen Nukleotid- basierten Inhibitoren für die onkogene KRAS ^{G13C} -Variante“ ¹⁸¹	149
Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Kovalente Adressierung von KRAS ^{G13C} mit niedermolekularen Verbindungen“	157
Literaturverzeichnis	170
Anhang	190
Kompetitiver Assay von eda-GDP für KRAS ^{G13C}	190
Kristallisation von KRAS ^{G12C} :GDP <i>Soaking</i> -Experiment mit 6c	190
Kristallisation von KRAS ^{G13C} - 15b	191
MD-Simulationen.....	191
Datenstatistiken der K/NRAS-Kristallstrukturen	192
Repräsentative Dockingergebnisse der Verbindungen 26a , 26b und 26c	194
Vollständige Proteinreinigung von HRAS ^{G13C} (<i>Cys-light</i>).....	195
Sequenzvergleich on KRAS ^{G13C} und HRAS ^{G13C} (<i>Cys-light</i>)	196
LC/MS-Spektren.....	197
HRMS-Spektren	207
NMR-Spektren	211
Eidesstattliche Versicherung (Affidavit).....	228

Abkürzungsverzeichnis

ABPP	<i>Activity-based Protein Profiling</i>
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BTK	<i>Bruton's Tyrosin Kinase</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CAAI	<i>Covalent-allosteric AKT inhibitors</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CDI	Carbonyldiimidazol
CHES	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CML	Chronische myeloische Leukämie
CovClick	<i>Covalent in situ Click-chemistry</i>
CTG	CellTiterGlo
CuAAC	Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition
d	Tag(e)
DNA	<i>Deoxyribonucleotide acid</i>
DCM	Dichlormethan
dd	Doppelt destilliert

DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
eda	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FA	<i>Formic acid</i>
FBS	Fötale Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GppNHp	Guanosine-5'-[(β,γ)-imido]triphosphat
h	Stunde

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	Human epidermal growthfactor receptor 2
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma</i>
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HVR	Hypervariable Region
IEX	<i>Ionenaustauschchromatographie</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_I	Reversible Bindungsaffinität
K_D	Dissoziationskonstante
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mantdGDP	3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-2'-deoxyguanosin-5'-diphosphat
MD	Molekulardynamisch
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NCT	<i>National clinical trial number</i>
NF1	Neurofibromin 1
Ni-AC	Nickelaffinitätschromatographie
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
ovn	Über Nacht
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDB	Protein Daten Bank
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PROTAC	<i>Proteolysis-targeting-Chimeras</i>
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Raf-RBD	Raf-RAS-Bindungsdomäne
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
r.m.s.d.	<i>Root-mean-square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase

SAR	<i>Structure activity relationship</i>
SBDD	<i>Structure-based drug design</i>
SRB-Assay	Sulforhodamin-B-Assay
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SOS 1/2	<i>Son of sevenless 1/2</i>
SWIIP	<i>Switch-II pocket</i>
TBA	Tributylamin
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEAB	Triethylammoniumbromid
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluoroessigsäure
TGS	<i>Target-Guided Synthesis</i>
THF	Tetrahydrofuran
TLC-MS	Dünnschichtchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

Kurzfassung

Die kleine GTPase KRAS fungiert als entscheidender molekularer Schalter in verschiedenen zellulären Prozessen, indem sie zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechselt. Mutationen in RAS, die in etwa 25 % aller menschlichen Krebsarten vorkommen, können diesen fein abgestimmten Regulationsmechanismus stören und zu einer Überaktivierung von Signalen führen, die das Zellwachstum fördern. Dies macht KRAS zu einem vielversprechenden Ziel für zielgerichtete Krebstherapien. Obwohl KRAS lange Zeit als „nicht adressierbar“ galt, widerlegte die Forschungsgruppe um SHOKAT im Jahr 2013 diese Annahme. Sie entdeckten eine bisher unbekannte allosterische Tasche unterhalb der *Switch-II*-Region (*Switch-II-Pocket*, SWIIP). Diese Entdeckung führte zur Entwicklung der ersten FDA-zugelassenen KRAS^{G12C}-Wirkstoffe Sotorasib und Adagrasib, die 2021 bzw. 2022 auf den Markt kamen und die Behandlung von KRAS-mutiertem Lungenkrebs revolutionierten. Ein wesentlicher Fokus dieser Forschungsarbeit lag auf der Entwicklung und Charakterisierung neuartiger Inhibitoren für die KRAS^{G12C}-Variante unter Verwendung einer Plattform, die eine Durchmusterung verschiedener Strukturelemente ermöglicht. Ausgangspunkt war ein etabliertes Strukturmotiv, das in vielen KRAS-Inhibitoren vorkommt. Dieses wurde weiter funktionalisiert, indem ein MICHAEL-Akzeptor und eine Alkylgruppe hinzugefügt wurden. Mithilfe eines Platten-basierten Ansatzes wurde das Fragment durch eine CuAAC-Reaktion mit 448 verschiedenen Aziden diversifiziert und anschließend mittels eines zellulären Screenings nach *Hit*-Molekülen gesucht. Zur Validierung wurden die sechs *Hits* re-synthetisiert und sowohl biochemisch als auch zellulär weiter charakterisiert. Diese Strategie ermöglichte es, wertvolle Ausgangspunkte für neue Liganden zu generieren, die kovalent an die KRAS^{G12C}-Mutante binden können. Strukturelle Einblicke in die Protein-Liganden-Bindung könnten das rationale Liganden-Design unterstützen und künftig zu modifizierten Verbindungen führen, die hinsichtlich ihrer Potenz gegenüber KRAS^{G12C} optimiert sind. Neben KRAS^{G12C} wurde auch die kaum erforschte KRAS^{G13C}-Mutation untersucht, die bei etwa 6 % der Lungenkrebspatienten auftritt. Zwei Ansätze zur kovalenten und selektiven Bindung dieser Mutation wurden verfolgt: Modifizierte, GDP-basierte Nukleotidanaloga und

alternativ niedermolekulare Inhibitoren, die auf dem Pyridopyrimidin-Grundgerüst basieren und das mutierte Cys13 als kovalenten Ankerpunkt nutzen. Ziel war es, innovative Inhibitoren zu entwickeln, welche die biologischen Rollen dieser Mutationen aufklären und potenzielle therapeutische Optionen bieten. In einem ersten Projekt wurde der Ansatz verfolgt, orthosterische, Nukleotid-basierte Inhibitoren zu entwickeln, die mit dem natürlichen Substrat GDP um die Bindungstasche konkurrieren. Durch das Anfügen eines Linkers und einer Cys-reaktiven Gruppe (*warhead*) an GDP entstanden Moleküle, die kovalent an das mutierte Cys13 binden können. Im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten wurden zyklische Linkermotive anstelle von linearen gewählt, um eine verbesserte Reaktivität zu erreichen. Mit einer neu entwickelten, konvergenten Syntheseroute konnten neun Verbindungen hergestellt werden, welche in MS- und biochemischen Studien ihre kovalente Bindung und inhibitorische Wirksamkeit gegenüber KRAS^{G13C} nachwiesen. Zusätzlich wurde der gewünschte Bindungsmodus erfolgreich in Ko-Kristallisations-Experimenten bestätigt. Künftige MD-Simulationen könnten helfen, neue Linkermotive zu identifizieren, die die Prä-Organisation der Moleküle verbessern und so zur Steigerung der Bindungseffizienz beitragen. In einem dritten Projekt wurden niedermolekulare Verbindungen, die bereits zur Bindung der SWIIP in KRAS^{G12X} beschrieben worden waren, mit einem speziellen Linkermotiv erweitert, sodass ein *warhead* das mutierte Cys13 erreichen kann. Eine robuste Syntheseroute ermöglichte die Erstellung einer fokussierten Substanzbibliothek. Massenspektrometrie-Experimente bestätigten die erwartete kovalente Bindung an KRAS^{G13C}. In einem von GIST-T1-Zellen abgeleitete Zelllinie, welche das Onkogen KRAS^{G13C} trägt, konnten erste Effekte im zellulären Modell nachgewiesen werden. Optimierungsversuche könnten die Bindungseffizienz dieser neuen Inhibitoren weiter steigern. In einem vierten Projekt wurden AKT2-spezifische Sondenmoleküle verwendet, um weniger invasive Perturbationsstudien im Vergleich zu Knockout-Studien durchzuführen. Die Alkin-Funktionalität dieser Sonden ermöglichte die Einführung von Reportergruppen (Fluorophore, Affinitätstags) mittels Click-Reaktion. Ein robustes Pulldown-Protokoll wurde in AKT2-exprimierenden Zellen etabliert, das zur Validierung der AKT2-Selektivität und zur Identifikation von möglichen Interaktionspartnern durch MS/MS-Experimente genutzt wurde

Abstract

The small GTPase KRAS acts as a crucial molecular switch in various cellular processes by switching between an inactive, GDP-bound state and an active, GTP-bound state. Mutations in RAS, which occur in about 25 % of all human cancers, can disrupt this finely tuned regulatory mechanism and lead to an overactivation of signals that promote cell growth. This makes KRAS a promising target for targeted cancer therapies. Although KRAS was long considered “undruggable”, SHOKAT's research group disproved this assumption in 2013. They discovered a previously unknown allosteric pocket below the switch II region (switch II pocket, SWIIP). This discovery led to the development of the first FDA-approved KRAS^{G12C} drugs, sotorasib and adagrasib, which were launched in 2021 and 2022 respectively and revolutionized the treatment of KRAS-mutated lung cancer. A major focus of this research was the development and characterization of novel inhibitors for the KRAS^{G12C} variant using a platform that enables high-throughput screening. The starting point was an established structural element that occurs in many KRAS inhibitors. This was further functionalized by adding a MICHAEL acceptor and an alkyne group. Using a plate-based approach, the fragment was diversified by a CuAAC reaction with 448 different azides and subsequently screened for hit molecules by cellular screening. For validation, the six hits were resynthesized and further characterized both biochemically and cellularly. This strategy made it possible to generate valuable starting points for new ligands that can bind covalently to the KRAS^{G12C} mutant. Structural insights into protein-ligand binding could support rational ligand design and lead to modified compounds optimized for potency against KRAS^{G12C} in the future. In addition to KRAS^{G12C}, the little-studied KRAS^{G13C} mutation, which occurs in about 6% of lung cancer patients, was also investigated. Two approaches for covalent and selective binding of this mutation were pursued: modified, GDP-based nucleotide analogs and alternatively small molecule inhibitors based on the pyridopyrimidine backbone and using the mutated Cys13 as a covalent anchor point. The aim is to develop innovative inhibitors that elucidate the biological roles of these mutations and offer potential therapeutic options.

In a first project, the approach was to develop orthosteric, nucleotide-based inhibitors that compete with the natural substrate GDP for the binding pocket. By attaching a linker and a Cys-reactive group (warhead) to GDP, molecules were created that can bind covalently to the mutated Cys13. In comparison to previous work, cyclic linker motifs were chosen instead of linear ones in order to achieve improved reactivity. Using a newly developed convergent synthesis route, nine compounds were prepared, which demonstrated their covalent binding and inhibitory activity against KRAS^{G13C} in MS and biochemical studies. In addition, the desired binding mode was successfully confirmed in co-crystallization experiments. Future MD simulations could help to identify new linker motifs that improve the pre-organization of the molecules and thus contribute to increasing the binding efficiency. In a third project, small molecule compounds that had already been described to bind SWIP in KRAS^{G12X} were extended with a specific linker motif so that a warhead can reach the mutant Cys13. A robust synthesis route enabled the creation of a focused compound library. Mass spectrometry experiments confirmed the expected covalent binding to KRAS^{G13C}. In a cell line derived from GIST-T1 cells, which carries the oncogene KRAS^{G13C}, initial effects could be demonstrated in the cellular model. Optimization trials could further increase the binding efficiency of these new inhibitors. In a fourth project, AKT2-specific probe molecules were used to perform less invasive perturbation studies compared to knockout studies. The alkyne functionality of these probes allowed the introduction of reporter groups (fluorophores, affinity tags) via click reaction. A robust pull-down protocol was established in AKT2-expressing cells, which was used to validate AKT2 selectivity and to identify interaction partners by MS/MS experiments.

Einleitung

Unsere heutige Gesellschaft steht vor einer Vielzahl von Herausforderungen, darunter der demografische Wandel mit einer alternden Bevölkerung, das Auftreten von Pandemien, bewaffnete Konflikte und wirtschaftliche Krisen. Zusätzlich zu diesen globalen Herausforderungen stellen Erkrankungen mit erhöhter Mortalitätsrate ein weiteres drängendes Problem dar. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Krebs neben Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit.¹

Krebs - eine Erkrankung des Genoms - kann jedes Körpergewebe betreffen und ist durch unkontrolliertes Zellwachstum gekennzeichnet, was oft zur Bildung von Tumoren führt. Eine häufig tödlich verlaufende Komplikation ist die Metastasierung, bei der Tumorzellen über das Blutsystem in gesundes Gewebe gelangen und neue Tumore bilden.² Neben erhöhter Zellproliferation und -migration identifizierten HANNAHAN und WEINBERG im Jahr 2000 sechs Merkmale maligner Tumorzellen, die als die „*Hallmarks of Cancer*“ bekannt sind. Diese umfassen die Umgehung der Apoptose, die Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen und die fortwährende Angiogenese.² Im Jahr 2011 wurden vier weitere Eigenschaften hinzugefügt, darunter die tumorfördernde und entzündliche Umgebung, genomische Instabilität und Mutationspotenzial, Deregulation des zellulären Energiestoffwechsels und die Umgehung der immunologischen Erkennung.³ Die chirurgische Entfernung des bösartigen Gewebes gilt als Mittel der Wahl nach der Diagnose eines malignen Tumors. Wenn dies nicht möglich ist, wurde lange Zeit ausschließlich auf Chemo- und Strahlentherapie zurückgegriffen. Diese Therapien haben jedoch aufgrund ihres nicht-selektiven Wirkmechanismus Nebenwirkungen und beeinträchtigen die Lebensqualität der Patienten erheblich.^{4, 5} Angesichts dieser Herausforderungen konzentrieren sich moderne Forschungsarbeiten zunehmend auf die Immuno-Onkologie und die zielgerichtete Krebstherapie.^{6, 7}

Diese haben bedeutende Fortschritte gemacht und tragen nicht nur zu einer verbesserten Lebensqualität bei, sondern haben auch die Lebenserwartung der Patienten erhöht. Diese Entwicklungen markieren einen Wendepunkt in der Krebsmedizin.⁸

Präzisionsmedizin

Neben den Erkenntnissen aus den „*Hallmarks of Cancer*“, die die grundlegenden zellulären Unterschiede zwischen gesunden und Krebszellen darlegen, leistete die umfassende Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2003 einen maßgeblichen Beitrag zur Entwicklung der Präzisionsmedizin und bildete die Grundlage für innovative Therapieansätze.⁹ Dieser Meilenstein führte zu einem vertieften Verständnis genetischer Läsionen in der Pathogenese und verhalf zur Identifikation prädiktiver Biomarker.^{10,11} Anhand dieser Biomarker werden Patienten stratifiziert und mit maßgeschneiderten Therapieansätzen behandelt.^{12, 13} Viele Ansätze der zielgerichteten Krebsmedizin stützen sich auf den von HANAHAN und WEINBERG postulierten Mechanismus der „*oncogene addiction*“,¹⁴ wobei Krebszellen von onkogenen Signalen abhängig sind. Durch Ausschalten dieses Signals, beispielsweise mittels eines niedermolekularen Inhibitors, erleidet die Zelle einen „*oncogenic shock*“ und stirbt ab.^{3, 15} Da gesunde Zellen nicht von diesem Signal abhängig sind und auf alternative Signalwege ausweichen können, bietet diese Herangehensweise Selektivität gegenüber nicht-malignen Zellen, wodurch sich die Wirksamkeit der Behandlung verbessert und Nebenwirkungen reduziert werden.^{13, 16} Ein herausragendes und äußerst erfolgreiches Beispiel in der Präzisionsonkologie ist der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitor Imatinib (Gleevec®).¹⁷ Dieser Inhibitor bindet an das Fusionsprotein Bcr-Abl, das den treibenden Faktor für die chronisch myeloische Leukämie (CML) darstellt.¹⁸ Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden, konnten oftmals ihre 8-Jahres-Überlebensrate von 20 % auf 87 % steigern.¹⁹ Diese Erfolgsgeschichte markiert den Beginn der onkologischen Präzisionsmedizin und hat den Weg für Behandlungsstrategien geebnet, die auf niedermolekularen Verbindungen basieren, wie beispielsweise Osimertinib (Tagrisso®) für Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR)^{20, 21} oder Acalabrutinib (Calquence®) zur Behandlung von *Bruton's Tyrosin Kinase* (BTK) getriebenem Krebs.^{22, 23} Trotz ihrer Erfolge weisen diese Behandlungsstrategien gewisse Limitationen auf, darunter die Entstehung von Resistenzmutationen.²⁴⁻²⁶ Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung innovativer Herangehensweisen in der Krebsmedizin.

Neben der erfolgreichen Adressierung von Proteinkinasen stellen weitere Onkogene, wie beispielsweise GTPasen, wichtige Zielstrukturen dar. Insbesondere die kleine GTPase *Rat Sarcoma* (RAS) ist eines der prominentesten Onkogene und Mutationen innerhalb dieses Gens können in 20-30 % aller humanen Tumoren gefunden werden.^{27,28}

Die kleine GTPase RAS

Struktur und Funktion

Die Familie der kleinen GTPasen besteht aus fünf Subfamilien (RAS-, Rho-, Rab-, Ran- und Sar1/Arf-Familie) und umfasst insgesamt ~ 150 Mitglieder.²⁹ Die RAS-Gene wurden als einige der ersten Onkogene in retroviralen Sarkomen bei Ratten identifiziert, was zu ihrer Namensgebung führte.³⁰ Die kleine GTPase RAS besteht aus drei Isoformen (N (Neuroblastoma) -, H (Harvey) -, K (Kirsten) - RAS) sowie zwei Spleiß-Varianten von KRAS (KRAS4a und 4b). Die drei Isoformen sind hinsichtlich ihrer Sequenz und Funktion sehr ähnlich, was im Folgenden näher erläutert werden soll.³¹⁻³⁴ Ein bedeutendes Strukturmotiv ist die Guanin-Nukleotid-bindende Domäne (G-Domäne), die sich aus fünf hochkonservierten Strukturmotiven (G1-G5) sowie der C-terminalen hypervariablen Region (HVR) zusammensetzt. Letztere wird posttranslational durch Farnesylierungs- und Palmitoylierungsreaktionen mit Lipidgruppen modifiziert, die für die Verankerung in der Membran verantwortlich sind und damit die subzelluläre Lokalisation beeinflussen. Innerhalb der G-Domäne sorgen spezifische Interaktionen für die Koordination von Mg^{2+} , was für die Funktion der Hydrolysereaktion von zentraler Bedeutung ist.^{35,36}

Angefangen mit dem G1-Motiv, auch *P-Loop* genannt: Dieses hoch konservierte Strukturelement mit der Sequenz GxxxxGK(S/T) ist neben der Bindung des α - und β -Phosphats des Guanin-Nukleotids auch an der Mg^{2+} -Koordination beteiligt.³⁷

Das Threonin (G2-Motiv) innerhalb der sogenannten *Switch-I*-Region sowie Strukturelemente aus der *Switch-II*-Region (DxxG, G3-Motiv) sind ebenfalls an der Koordination des Mg^{2+} beteiligt sowie an der Bindung des γ -Phosphats des Guanosintriphosphats (GTPs).³⁸

In Abhängigkeit der Nukleotid-Bindung (Guanosindiphosphat (GDP) oder GTP) induzieren die veränderten Wechselwirkungen der G2- und G3-Motive strukturelle Veränderungen der *Switch-I*- und *Switch-II*-Region, was zu einem veränderten Bindungsverhalten mit Effektorproteinen führt (Abbildung 1).³⁹

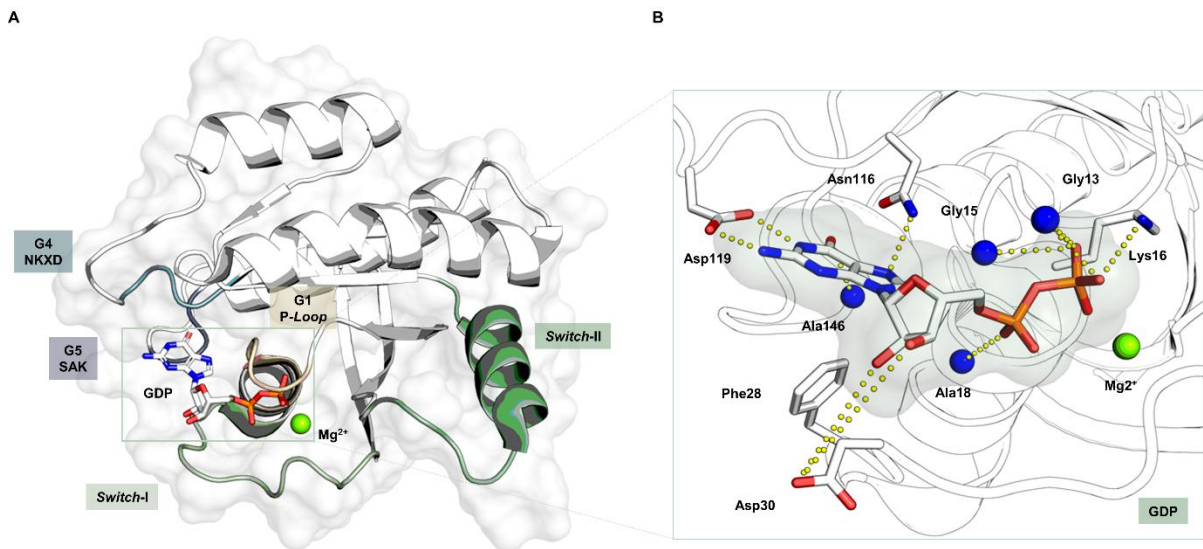


Abbildung 1. Überblick über den strukturellen Aufbau der kleinen GTPase KRAS. **A:** Kristallstruktur von KRAS^{wt} im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand (PDB 4OBE). Charakteristische Bereiche sind farblich hervorgehoben. **B:** Detaillierter Einblick in die Ligandenbindung von GDP in KRAS^{wt}. Wechselwirkungen sind farblich hervorgehoben.

Signalweiterleitung über RAS-Proteine

Membranständige RAS-Proteine fungieren innerhalb der Zelle als molekulare Schalter, indem sie zwischen dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und dem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechseln.⁴⁰ Die Kaskade wird durch extrazelluläre Stimuli, wie beispielsweise über EGFR initiiert, welcher das Adapterprotein *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2) rekrutiert. GRB2 kann Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl. *guanine nucleotide exchange factors*, GEFs), wie *Son of Sevenless 1* und *2* (SOS1/2), binden und an die Membran lokalisieren. GEFs katalysieren den Nukleotid-Austausch können so RAS in den aktiven Zustand versetzen.⁴¹ Die Gegenspieler der GEFs sind GTPase-aktivierende Proteine (engl. *GTPase-activating protein* (GAPs)), wie Neurofibromin 1 (NF1), welche die GTPase-Aktivität anregen und somit die Signaltransduktion terminieren (Abbildung 2).⁴²

Wichtige Signalwege, in denen RAS involviert ist, sind beispielsweise die Raf/MEK/ERK- sowie die PI3K/PDK1/AKT-Kaskade, welche eine zentrale Rolle in zellulären Prozessen wie Zellüberleben, Apoptose und Migration spielen. Die Überaktivierung von Signalwegen, die mit RAS assoziiert sind, hat weitreichende Auswirkungen auf die Kontrolle des Zellüberlebens (Abbildung 2).⁴³ Eine der pathologischen Konsequenzen einer solchen Überaktivierung ist die Entstehung von Krebserkrankungen. *Upstream* von RAS führt beispielsweise eine Überexpression vom humanen epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor* (Her2)) zu 30 % aller Brustkrebsarten.^{44, 45} Proteine, die direkt mit RAS assoziiert sind, haben die Fähigkeit, die Karzinogenese voranzutreiben. Ein Beispiel hierfür ist die Deletion des GAPs NF1 in Kombination mit einer KRAS-Mutation, was zu Fällen von akuter myeloischer Leukämie (AML) führen kann.⁴⁶ Mutationen in RAS-nachgeschalteten Proteinen wie B- *rapidly accelerated fibrosarcoma* (BRAF) und *Extracellular-signal Regulated Kinase* (Erk) sind an der Entstehung von Melanomen beteiligt.^{47, 48} Ebenfalls können Mutationen des Tumorsuppressors *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) sowie Aktivierungen von *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) und AKT zu diversen Krebsarten führen. Häufiger finden sich jedoch aktivierende Mutationen im RAS-Gen.⁴⁹

KRAS ist das häufigste, mutierte Onkogen (86 %), gefolgt von NRAS (11 %) und HRAS (3 %). Die meisten Punktmutationen lassen sich in den G-Domänen finden und betreffen die Codons G12, G13 und Q6. Diese beeinflussen unter anderem die Interaktion mit GAPs und begünstigen, dass GTP nicht hydrolysiert werden kann und somit RAS vorwiegend im aktiven Zustand verbleibt.

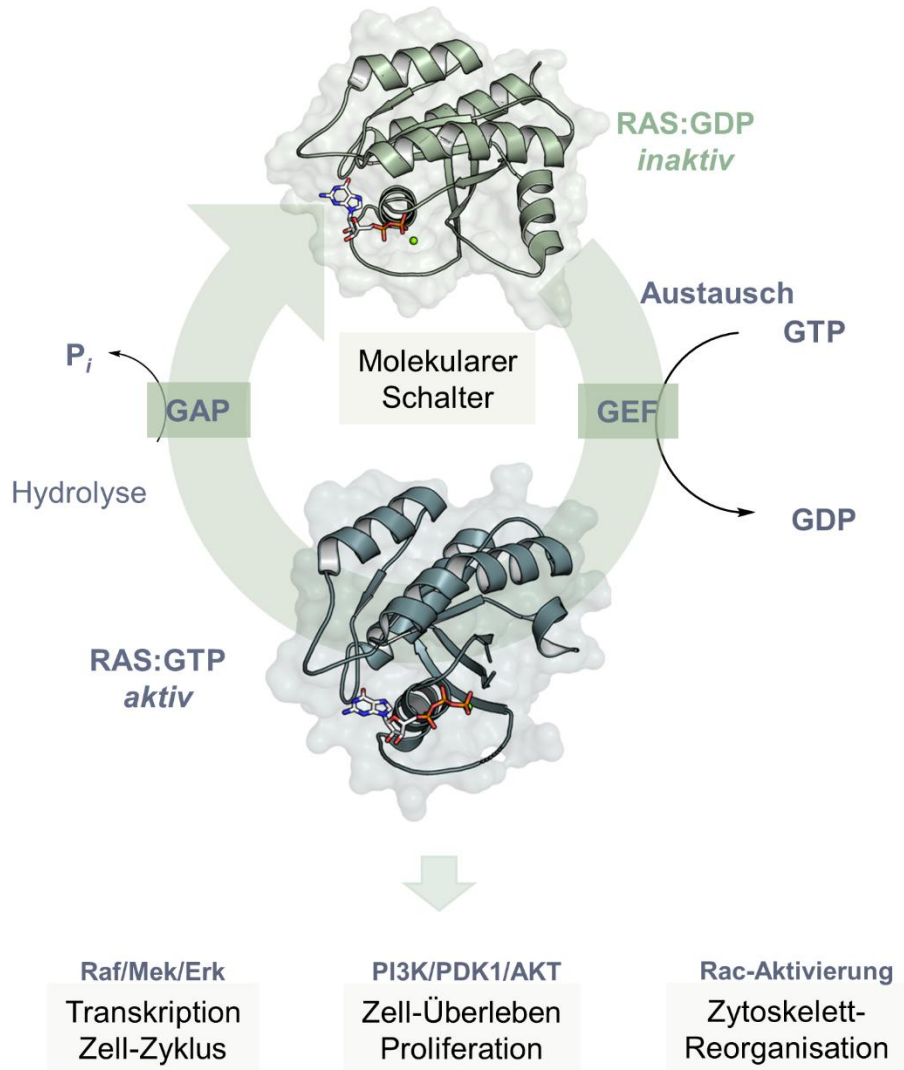


Abbildung 2. Aktivierungszyklus der GTPase RAS. Inaktives RAS:GDP wird mit Hilfe eines GEFs, welches GDP gegen GTP austauscht, aktiviert. Aktiviertes RAS:GTP initiiert mehrere Signalkaskaden wie bspw. den Raf/Mek/Erk oder P13K/PDK1/AKT-Signalweg. Die Aktivierung wird umgekehrt mit GAPs, wobei das GTP zu GDP hydrolysiert wird. Abbildung adaptiert von VAN HATTUM *et al.*⁴³ PDB 4OBE, 5VQ2.

Hierbei unterscheiden sich die onkogenen Mutationen an Position 12 und 13, welche sich im P-Loop befinden, von denen am Hotspot Q61. Kommt es zu einer Punktmutation an Codon 12 und 13, so verhindert ein sterischer Konflikt die Interaktion mit dem Argininfinger eines GAPs.

Es konnte weiterhin eine verminderte intrinsische GTP-Hydrolyserate festgestellt werden.⁴⁰ Bei G13D-mutierten RAS-Varianten kommt eine erhöhte, von GEFs unabhängige Nukleotid-Austauschrate hinzu. Bei Q61-Mutanten hingegen verhindert die Mutation die korrekte Positionierung eines katalytischen Wassermoleküls, das für die GTP-Hydrolyse essenziell ist. Auch bei diesen Mutanten zeigt sich eine deutlich verminderte GAP-katalysierte Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3).⁵⁰

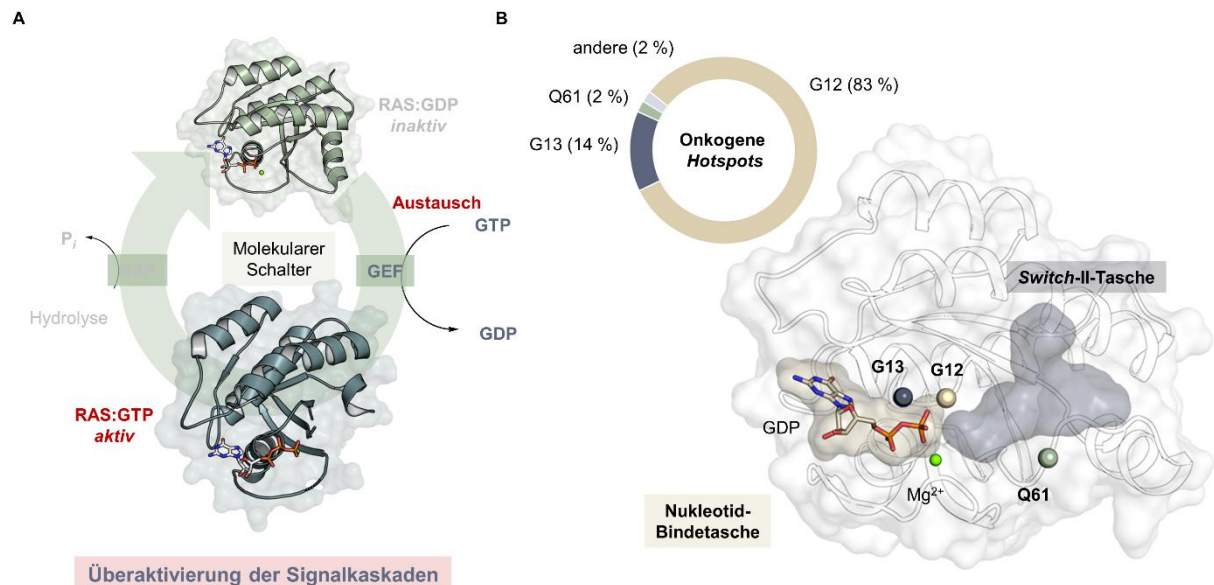


Abbildung 3. A: Dysregulierung des Schalter-Mechanismus, welches das Gleichgewicht zum aktivierten GTP-gebundenen RAS verschiebt und somit zu einer Überaktivierung der Signalwege führt. **B:** Hotspot-Mutationen innerhalb des KRAS-Proteins, welche zu einer erhöhten Aktivität von KRAS führen können. PDB 4OBE, 5VQ2.

Zielgerichtete Adressierung von KRAS¹

Obwohl RAS eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese zukommt, gab es lange Zeit keine erfolgreichen Ansätze, RAS gezielt zu adressieren und somit zu inhibieren. Ein Grund war die flache Oberfläche des Proteins, die keine ersichtlichen Kavitäten für potenzielle Binder bietet. Anders als bei dem erfolgreichen Konzept der Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitiven Kinase-Inhibitoren stellt die GDP-Bindungstasche bei RAS keine geeignete Bindungsstelle für Inhibitoren dar.⁵¹ Die Affinität für GDP und GTP, welche sich im picomolaren Bereich befindet, gepaart mit der sehr hohen intrazellulären Konzentration von GDP (40 μM) und GTP (400 μM), ist eine zu große Hürde für die Entwicklung von Nukleotid-kompetitiven RAS-Inhibitoren.^{52, 53} Dieses Konzept wurde dennoch erfolgreich durch den Einsatz von kovalent-bindenden Nukleotid-Analoga angewandt.⁵⁴ Weiterhin richtete sich der Fokus auf andere Strategien. Beispielsweise wurde am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE in Dortmund versucht, die korrekte zelluläre Lokalisation von RAS zu stören.⁵⁵⁻⁵⁷ Auch die Störung der Protein-Protein-Interaktion (PPI) von RAS zu seinem Effektor SOS durch eine niedermolekulare Verbindung führte zu dem vielversprechenden Kandidaten BI-1701963.⁵⁸

Der Durchbruch zur gezielten Adressierung von KRAS gelang dem Labor von KEVAN SHOKAT im Jahr 2013. Mithilfe des sogenannten *Tethering*-Ansatzes, der eine fragment-basierte Durchmusterung einer aus 480 Molekülen bestehenden Disulfid-Bibliothek beschreibt, konnten geeignete Binder identifiziert werden, die kovalent (über eine Disulfidbrücke) an die KRAS^{G12C}-Variante binden.⁵⁹ Durch eine Kristallstruktur von KRAS^{G12C} im Komplex mit einem der detektierten Hits bestätigte sich der kovalente Bindungscharakter und es offenbarte sich eine zuvor unentdeckte Tasche unterhalb der *Switch-II*-Region neben der Nukleotid-Bindetasche. Diese wurde durch die Neuorientierung der *Switch-II*-Region verursacht. In weiteren biochemischen Assays zeigte sich, dass hierbei der inaktive GDP-gebundene Zustand von KRAS stabilisiert wird und die Signalweiterleitung gestört wird, da keine Interaktion mit SOS und Raf stattfinden kann.

¹ Teile dieses Abschnittes wurden bereits in Form eines *Reviews* (KIRSCHNER *et al.*) publiziert.

Das erworbene Cystein stellt hierbei den kovalenten Ankerpunkt dar und ermöglicht eine Mutanten-selektive Adressierung, welche den Wildtypen (wt) umgeht. Lange Zeit gab es Bedenken gegenüber kovalenten Inhibitoren aufgrund einer potenziellen Toxizität, welche durch eine unspezifische kovalente Modifikation von Proteinen verursacht werden kann.⁶⁰ Weiter kann es zu der Entstehung von Resistenzmutationen kommen, wodurch die gewünschte Aminosäure aufgrund von Reaktivitätsunterschieden nicht mehr adressiert werden kann.⁶¹ Dennoch konnte die erfolgreiche kovalente Adressierung in der zielgerichteten Krebstherapie anhand von Beispielen wie den Kinase-Inhibitoren Neratinib⁶² oder Osimertinib⁶³ gezeigt werden. Bei diesen fungiert eine α,β -ungesättigte Gruppe, eine Acryloylgruppe, als *warhead* und geht in einer MICHAEL-artigen Reaktion eine kovalente Bindung zum Protein ein. Dies hat den Vorteil einer gesteigerten Verweildauer am Protein; die Bindung des Liganden am Zielprotein wird lediglich durch die Degradation des Proteins limitiert.^{61, 64} Hinzu kommt häufig eine gesteigerte Potenz des Inhibitors, da keine Dissoziation des Liganden stattfindet.^{65, 66} Die erfolgreiche Entdeckung der sogenannten *Switch-II-Pocket* (SWIIP) legte den Grundstein für die kürzlich von der U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen KRAS-Inhibitoren Sotorasib (AMG510, LUMYKRAS[®], Amgen) (**4**)⁶⁷ und Adagrasib (MRTX849, KRAZATI[®], Bristol Myers Squibb) (**1**),^{68, 69} welche die Behandlung von KRAS^{G12C}-mutierten Lungenkrebs revolutionierten.⁷⁰ Die Entwicklung von Inhibitoren für häufig auftretende somatische Mutationen von KRAS, mit Ausnahme von G12C, war bisher nicht realisierbar, da diese Inhibitoren mutanten-spezifisch sind und auf die kovalente Bindung an Cys12 angewiesen sind. Daher blieb die gezielte Adressierung weiterer Mutanten bis vor Kurzem unerfüllt.⁷¹ Da die SWIIP als bevorzugte Bindungstasche für KRAS fungiert und direkten Zugang zum mutierten Rest an Position 12 bietet, wurden die Erkenntnisse aus der erfolgreichen Adressierung von KRAS^{G12C} genutzt, um Moleküle zu entwickeln, die andere relevante Mutationen adressieren. Hierzu wurden bereits bekannte SWIIP-Binder genutzt und mit reaktiven Gruppen bestückt, die - in den meisten Fällen - kovalent mit den erworbenen G12X-Mutationen reagieren können, ohne das wt-Protein zu beeinflussen. Diese aktuellen Erkenntnisse stellen innovative Werkzeuge für das Design von *warheads* dar, die nicht-katalytische Reste adressieren und über das herkömmliche Konzept der Cys-Modifikationen hinausgehen.

Die Ansätze eröffnen zudem neue Perspektiven für die gezielte Adressierung weiterer häufig auftretender Mutationen wie G12V und G12A. Die Konzepte sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.⁷¹

Abgesehen von der G12C-Mutation, die eine kausale Rolle bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) (42 %) ⁷² und bei kolorektalen Karzinomen (8 %) ⁷³ spielt, kommt es an Codon 12 ebenfalls zu einem Austausch von Glycin zu Glutamat (G12D), Arginin (G12R) und Serin (G12S).⁷¹ Die häufigste KRAS-Mutation ist die Punktmutation G12D⁷⁴, welche 39 % der Fälle von duktalem Pankreas-Adenokarzinom,⁷⁵ 36 % der kolorektalen Karzinome⁷³ und 17 % der NSCLC-Fälle ausmacht.^{72, 76} Da G12D die häufigste KRAS-Mutation ist, jedoch nicht über den kovalenten Ankerpunkt Cys12 verfügt, stellte sich die Herausforderung, wie ein Inhibitor wie Adagrasib (**1**) in einen wirksamen und selektiven Inhibitor für G12D umgewandelt werden könnte.⁷⁴ Da KRAS^{G12C}-Inhibitoren vergleichsweise schwache reversible Bindungsaffinitäten aufweisen (Adagrasib (**1**) $K_i = 3,7 \mu\text{M}$ ⁶⁸, Sotorasib (**4**) $K_i = 86 \mu\text{M}$ ⁶⁷, ARS-853 (**3**) $K_i = 200 \mu\text{M}$ ⁷⁷), mussten zwei wesentliche Hürden überwunden werden, um einen reversiblen Inhibitor für KRAS^{G12D} zu erhalten. Ein rein reversibler Inhibitor erforderte eine viel höhere Affinität und Selektivität, um die fehlende kovalente Bindung zu ersetzen. Hier diente Adagrasib (**1**) als Ausgangspunkt, da es die höchste reversible Affinität und zusätzliche günstige Wechselwirkungen im Vergleich zu anderen KRAS^{G12C}-Inhibitoren aufwies. Namentlich bildet der Cyanstickstoff eine Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe von Gly10, was die Bindungsaffinität erhöht. Zweitens bildet die *N*-Methylpyrrolidin-Gruppe an der C2-Position des Kerns eine ionische Wechselwirkung mit der Seitenkette von Glu62. In einer systematischen und iterativen Untersuchung, die die Modifikation verschiedener Substituenten an den 2-, 4- und 7-Positionen des kürzlich identifizierten Kernscaffolds Pyrido[4,3-*d*]pyrimidin umfasste, entdeckten WANG *et al.* ein Molekül mit bemerkenswert hoher Affinität und Selektivität gegenüber KRAS^{wt}, MRTX1133 (**2**). Die Ko-Kristallstruktur von KRAS^{G12D} im Komplex mit MRTX1133 (**2**) lieferte wertvolle Einblicke in die Wechselwirkungen, die zu dem niedrigen Dissoziationskonstanten (K_d) von $\sim 0,2 \text{ pM}$ beitragen. Die Modifikation an der 2-Position hat das Potenzial, eine günstige ionische Wechselwirkung mit Glu62 zu bilden.

Der Naphthyl-Substituent besetzt eine hydrophobe Tasche, die von Val9, Met72, Phe78, Ile100 und Val103 aufgespannt wird. Die angehängte Alkin-Gruppe interagiert weiter mit einem Wassermolekül, das von Gly10, Val8 und Thr58 koordiniert wird. Zudem bildet das starre bityklische Amin eine Salzbrücke mit dem erworbenen Asp12. Diese zusätzliche Wechselwirkung vermittelt eine ~ 500-fache Selektivität gegenüber KRAS^{wt} (Abbildung 4).^{74, 78} MRTX1133 (**2**) befindet sich derzeit in einer klinischen Studie (Phase 1/2) für Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die eine KRASG12D-Mutation aufweisen (NCT05737706). Darüber hinaus ebnete MRTX1133 (**2**) den Weg für das „Repurposing“ des Kerngrundgerüsts durch MIRATI PHARMACEUTICALS für weitere Mutanten-spezifische KRAS^{G12X}-Inhibitoren.

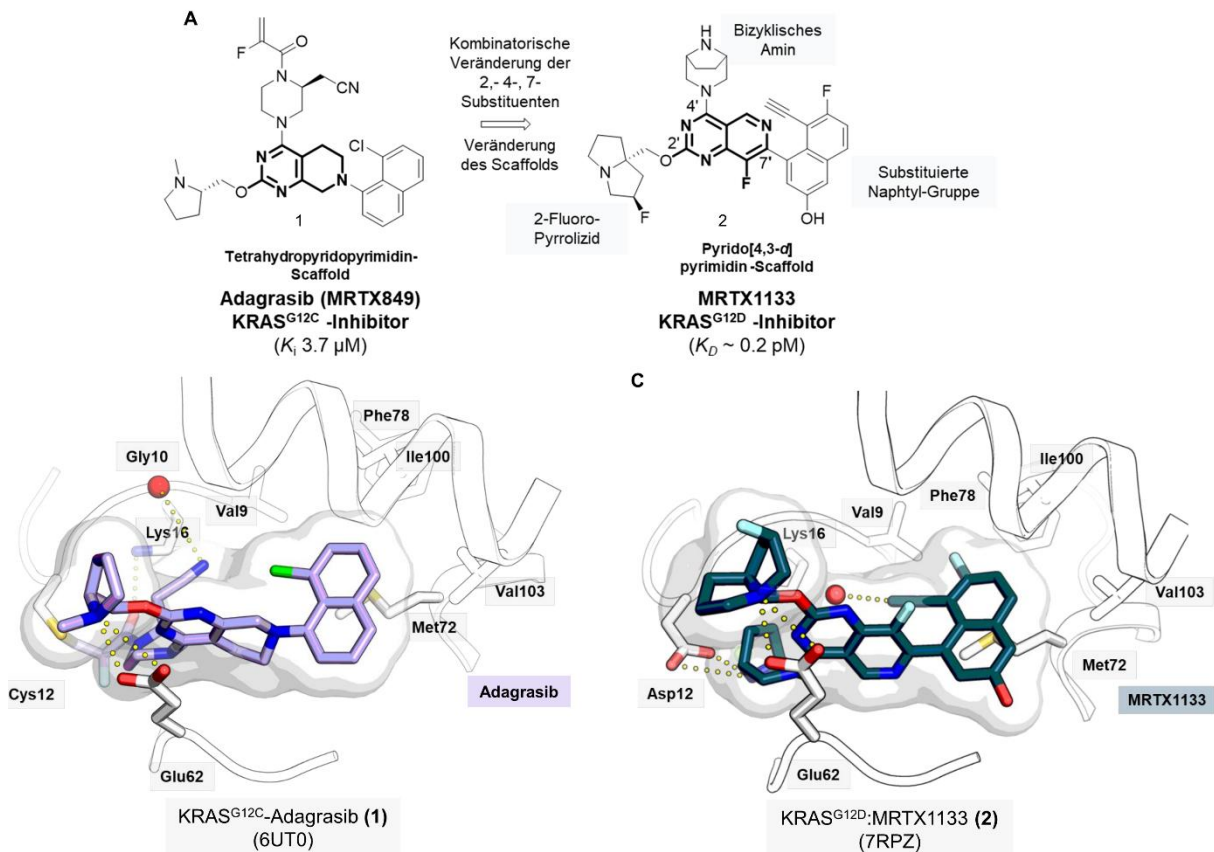


Abbildung 4. A: Darstellung des iterativen Optimierungsprozesses von Adagrasib (**1**) zu dem KRAS^{G12D} Inhibitor MRTX1133 (**2**). **B:** Ko-Kristallstruktur von Adagrasib kovalent gebunden in der KRAS^{G12C}-Mutante (PDB 6UT0).⁶⁸ **C:** Ko-Kristallstruktur von MRTX1133 (**2**) gebunden in der KRAS^{G12D}-Mutante (PDB 7RPZ).⁷⁸ Abbildung adaptiert von KIRSCHNER *et al.*⁷¹

Die zahlreichen Vorteile, die mit kovalenten Medikamenten verbunden sind, lassen sich in der Literatur in einer Reihe an Untersuchungen finden, wobei mutierte Aminosäuren in KRAS^{G12X} kovalent adressiert werden.

Hierzu wurde das für KRAS^{G12D} hinsichtlich seiner reversiblen Affinität optimierte Grundgerüst genutzt und mit reaktiven Gruppen dekoriert, welche die jeweils erworbene Aminosäure kovalent modifizieren. Da für die Aminosäuren Glutamat, Arginin und Serin geringere nukleophile Reaktivitäten im Vergleich zu Cysteinen berichtet wurden,⁷⁹⁻⁸¹ stellt die Adressierung dieser Aminosäureseitenketten eine besondere Herausforderung dar.

Über die kovalente Adressierung von G12D berichteten erstmalig YU *et al.* und ZHENG *et al.* Hierzu wurden bekannte SWIIP-Binder mit Oxiran- und Aziridin bzw. β -Lacton-basierten Elektrophile ausgestattet (Abbildung 5).^{79, 82} Diese konnten die gewünschte kovalente Modifikation des Asp in MS- und Ko-Kristallisations Studien bestätigen. Struktur-Aktivitäts-Beziehungsstudien (SAR) zeigten, dass insbesondere S-konfigurierte Oxirane ein erhöhtes Maß an kovalenter Proteinmodifikation aufweisen, was darauf hindeutet, dass diese Konfiguration des Elektrophils besser ausgerichtet ist, um mit Asp12 zu reagieren. Die resultierende Verbindung YK-8S (**4**) reagiert kovalent mit den KRAS-Proteinen G12D und G12C, die an GDP gebunden sind, sowie mit G12D, das an Guanosin-5'-[β,γ -imido]triphosphat (GppNHp) gebunden ist, während sie keine oder nur geringe Modifikationen für den WT von KRAS sowie die Mutanten G12R, G13D, Q61R und Q61K zeigt. Untersuchungen der Ko-Kristallstrukturen von YK-8S (**4**) im Komplex mit G12D (PDB 8JHL) und G12C (PDB 8JGD) zeigten, dass der Inhibitor in beiden Fällen eine vergleichbare Orientierung wie MRTX1133 (**2**) einnimmt und eine spezifische kovalente Bindung mit den mutierten Resten eingeht. Bemerkenswerterweise erfolgen die Angriffe auf Asp12 und Cys12 an verschiedenen Kohlenstoffatomen, erleichtert durch das Vorhandensein von zwei elektrophilen Atomen im Oxiranring. Dieser Unterschied wird der längeren Seitenkette von Asp12 zugeschrieben, die die 2-Position zugänglicher für den Angriff macht. Im Gegensatz dazu reagiert die kürzere Cys12 bevorzugt mit der unsubstituierten 1-Position. Erste *in-vitro*-Zellstudien zeigten jedoch nur geringe zelluläre Aktivitäten, was derzeit noch eine Einschränkung dieser Verbindungen darstellt.⁷⁹

Das Molekül (*RS*)-1 zeigte eine schnelle kovalente Markierung von KRAS^{G12D}, jedoch keine Reaktivität gegenüber KRAS^{wt} oder der nicht natürlich vorkommenden Mutante KRAS^{G12E}.

Da (*RS*)-1 mit dem aktiven, GTP-gebundenen Zustand von KRAS interagiert, untersuchten die Autoren dessen Einfluss auf die Bindung des nachgeschalteten Effektors. Sie beobachteten eine verringerte Bindung an die Raf-RAS-Bindungsdomäne (Raf-RBD) - eine bedeutende Erkenntnis, insbesondere angesichts der Tatsache, dass die G12D-Mutante eine stark beeinträchtigte GTP-Hydrolyse aufweist und daher vorwiegend im aktiven Zustand vorliegt. Das Molekül (*RS*)-1 wurde in mehreren Runden weiter optimiert und führte so zum Inhibitor (*R*)-7 (**6**). Diese Verbindung zeigte in zellulären Studien eine mutanten-spezifische Markierung und Hemmung gegenüber KRAS^{G12D}, jedoch keine Wirkung auf Krebszelllinien ohne die G12D-Mutation. Reversible Gegenstücke von (*R*)-7 (**6**) wiesen eine signifikant geringere zelluläre Potenz auf, was die Bedeutung der kovalenten Natur des Inhibitors verdeutlicht. Die Ko-Kristallstruktur (PDB 8T4V) von KRAS^{G12D} und (*RS*)-1 zeigte eine ähnliche Orientierung in der Bindungstasche wie der G12C-Inhibitor Adagrasib (**1**).⁸²

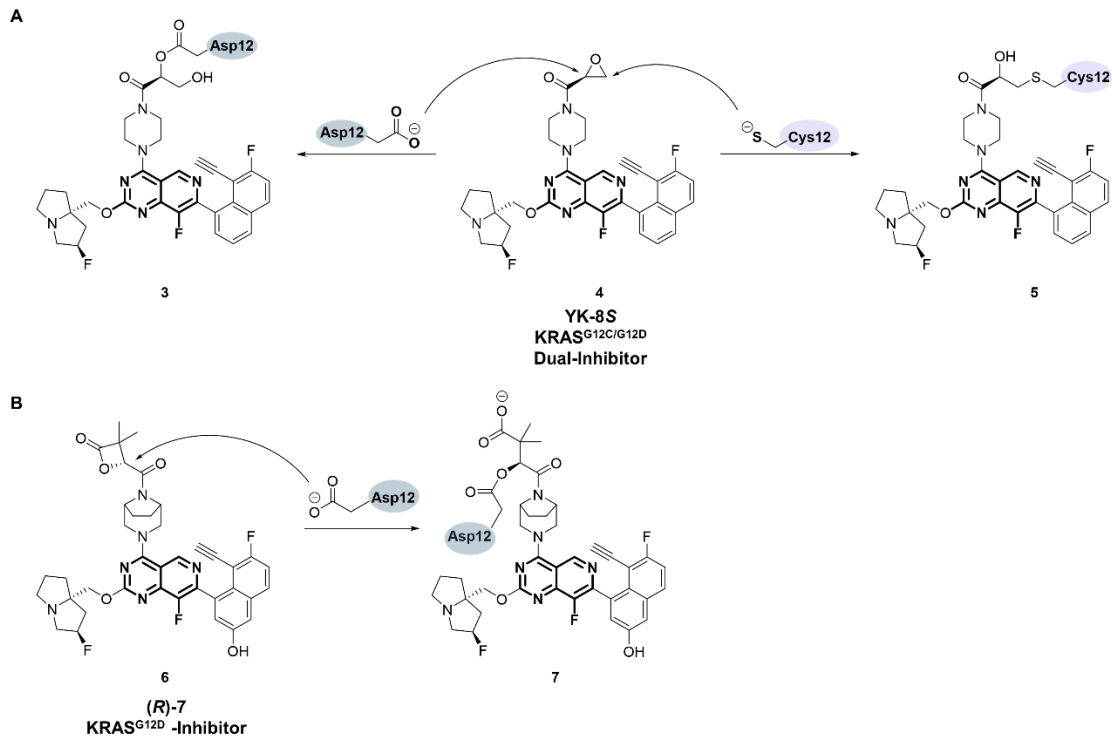


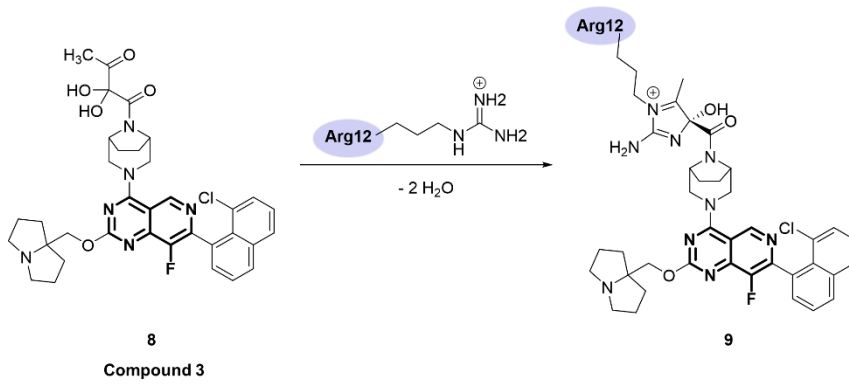
Abbildung 5. A: Reaktions-Mechanismus des Dual-Inhibitors YK-85 (**4**) mit den mutierten Aminosäuren Asp12 und Cys12 in den KRAS-Varianten G12D und G12C.⁷⁹ **B:** Reaktions-Mechanismus des KRAS^{G12D}-Inhibitors (R) 7 (**6**).⁷⁴ Abbildung adaptiert von KIRSCHNER *et al.*⁷¹

Die KRAS^{G12R}-Mutation tritt hauptsächlich bei Bauchspeicheldrüsenkrebs (17 %)⁷⁵ auf, ist jedoch auch in sehr wenigen Fällen von kolorektalem Krebs und NSCLC (~1 %)⁷² zu finden. In der Entwicklung neuer Inhibitoren, die KRAS^{G12R} gezielt ansprechen, funktionalisierten ZHANG *et al.* den üblicherweise verwendeten SWIIP-Binder mit einer potenten elektrophilen Gruppe: einem α,β -Diketoamid. Die daraus resultierende Verbindung 3 (**8**) zeigte bemerkenswerte Selektivität für KRAS^{G12R} gegenüber KRAS^{wt}, KRAS^{G12D}, KRAS^{G12V}, KRAS^{Q61R}, KRAS^{Q61K} und KRAS^{Q61L} (Abbildung 6). Obwohl Verbindung 3 (**8**) den SOS-vermittelten Nukleotid-Austausch inhibiert, wurde in KRAS^{G12R}-mutierten Zelllinien keine zelluläre Aktivität bei Konzentrationen unter 100 μ M nachgewiesen. Ähnlich wie andere Mutationen im Codon 12 beeinträchtigt G12R die GTPase-Aktivität, was zu einem überwiegend GTP-gebundenen Zustand von KRAS führt. Die Autoren vermuteten daher, dass Verbindung 3 (**8**) nur mit dem GDP-gebundenen Zustand interagieren kann und bestätigten dies durch die Beobachtung kovalenter Modifikationen von KRAS, wenn das Lysat mit einem Überschuss an GDP vorgeladen wurde.

Die strukturelle Analyse der Ko-Kristallstruktur (PDB 8CX5) zeigte, dass Verbindung 4 in der SWII-Pocket von KRAS^{G12R} bindet und Arg12 kovalent modifiziert.⁸¹

KRAS^{G12S}-Mutationen werden in 6 % der kolorektalen Karzinome⁷³ und in 5 % von NSCLC-Fällen beobachtet,⁷² was eine weitere bemerkenswerte Hotspot-Mutation darstellt. Ähnlich wie bei früheren Ansätzen verwendeten ZHANG *et al.* das MRTX1133 (**2**)-Grundgerüst und entwickelten Verbindung G12Si-5 (**10**), welches eine selektive, kovalente Bindung mit KRAS^{G12S} im Gegensatz zum KRAS^{wt}-Protein oder der GppNHp-gebundenen Form zeigte (Abbildung 6). Darüber hinaus hemmt G12Si-5 (**10**) den durch SOS katalysierten Nukleotidaustausch. Die Ko-Kristallstruktur von KRAS^{G12S} im Komplex mit G12Si-1, einem Analogon von G12Si-5 (**10**), lieferte Einblicke in die Bindung des Liganden und zeigte eine ähnliche Ausrichtung wie bei G12C-Verbindungen und bestätigte die beabsichtigte spezifische Acylierung von Ser12. Dabei öffnete sich der Ring, wodurch der Carbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrücke mit Lys16 ausbilden kann, und der sekundäre Alkohol wurde in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden, das durch das Rückgrat von Gly10 und ein Wassermolekül vermittelt wird.⁸⁰

A



B

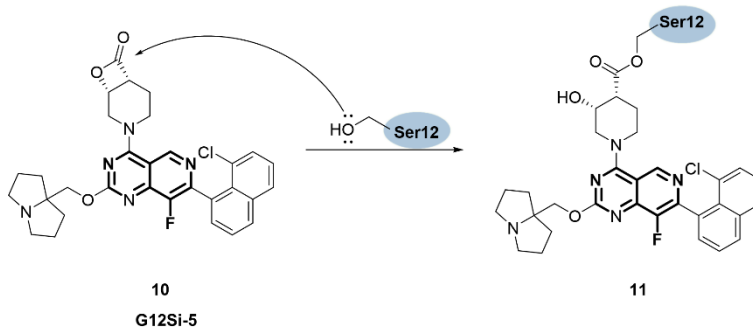


Abbildung 6. A: Reaktion von Compound 3 (**8**), was Arg12 in der KRAS^{G12R} Variante kovalent modifiziert.⁸¹ **B:** Reaktions-Mechanismus des Ser12 der KRAS^{G12S}-Variante mit G12Si-5 (**10**).⁸⁰ Abbildung adaptiert von KIRSCHNER *et al.*⁷¹

Herausforderungen und Chancen der Adressierung von onkogenen KRAS Varianten

Die Entwicklung von *warheads*, die nicht-katalytische Aminosäureseitenketten adressieren, stellt bedeutende Fortschritte im Bereich der Wirkstoffforschung dar. Diese können einerseits als wichtige Werkzeuge dienen, um die onkogene und biologische Rolle der jeweiligen KRAS-Mutanten in Perturbationsstudien zu untersuchen, und legen gleichzeitig einen wichtigen Grundstein für die Entwicklung potenzieller KRAS^{G12X}-Inhibitoren, die therapeutisch von großem Nutzen wären. Darüber hinaus erweitern sie das Spektrum an reaktiven Gruppen, die wichtige Anwendungen, beispielsweise in der aktivitätsbasierten Proteomprofilierung (ABPP), finden könnten. Dennoch stehen die hier diskutierten Verbindungen auch vor Herausforderungen und Limitationen. So bleibt abzuwarten, wie die gefundenen Ergebnisse in zelluläre Systeme, Tiermodelle und letztlich klinische Studien übersetzt werden können. Insbesondere können sie eine begrenzte Stabilität aufweisen, was ihre Wirksamkeit als therapeutische Wirkstoffe erheblich beeinträchtigen könnte. Diese Einschränkung unterstreicht die Notwendigkeit, Liganden weiter zu entwickeln und zu optimieren, die effektiv eine breitere Palette von KRAS-Mutationen ansprechen können, unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Eigenschaften und Stabilität, um ihre klinische Anwendbarkeit und ihr therapeutisches Potenzial zu verbessern. Darüber hinaus werden Resistenzmutationen in Zukunft eine zusätzliche Herausforderung darstellen, ähnlich den bereits bei Sotorasib (**4**)/ Adagrasib (**1**) beobachteten Resistenzmutationen.⁸³ Beachtenswert ist, dass bisher keine Liganden identifiziert wurden, die andere häufig auftretende KRAS-Mutanten wie KRAS^{G12V}, KRAS^{G13X} und KRAS^{Q61X} ansprechen.

Neben pan-RAS-Inhibitoren wie BI-2865⁸⁴ oder der Verwendung von Peptid-basierten KRAS-Inhibitoren, z.B. dem klinischen Kandidaten LUNA18,⁸⁵⁻⁸⁷ haben ZHANG und SHOKAT im Jahr 2019 erstmals die Existenz von "*molecular glues*" nachgewiesen, die eine Tri-Komplex-Bildung mit RAS (in seinem aktiven, GTP-gebundenen Zustand), dem Molekül selbst und dem ubiquitären Chaperon Cyclophilin A ermöglichen. Die Bildung dieses Tri-Komplexes stört direkt die Bindung an Effektoren/GEFs wie Raf-RBD, PI3K und SOS1.⁸⁸

Dieses Konzept wurde von REVOLUTION MEDICINES weiterentwickelt und führte zu einer Reihe von Allel-spezifischen Verbindungen (RAS^{G12C}: RMC-6291 NCT05462717 und NCT06162221; RAS^{G12D}: RMC-9805 NCT06040541; RAS^{G12V}: RMC-5127; RAS^{Q61H}: RMC-0708; RAS^{G13C}: RMC-8839) sowie einer RAS^{multi}-Verbindung (RMC-6236, NCT05379985 und NCT06162221). Diese Verbindungen befinden sich derzeit in klinischen Studien oder im IND-Stadium. Beachtenswert ist, dass sie auch Schlüsselmutationen wie KRAS^{G12V}, KRAS^{G13C} und KRAS^{Q61H} ansprechen, welche anderweitig nicht erfolgreich adressiert wurden.⁸⁹

Ein weiterer Ansatz basiert auf dem Prinzip der *Proteolysis-targeting-Chimeras* (PROTACs). In diesem Zusammenhang dienten etablierte KRAS^{G12C}-Binder als Ausgangspunkt, die mit einem Linker ausgestattet wurden und so ein Erkennungsmotiv für E3-Ligasen mit dem Molekül verbindet (z.B. XY-4-88, LC-2 und KP-14). Diese Verbindungen induzieren den Abbau von Proteinen, indem sie das Ubiquitinsystem der Zelle rekrutieren. Da diese G12C-Binder jedoch immer noch kovalent und damit irreversibel an das Zielprotein binden, können sie nicht, wie für PROTACs üblich als wiederverwendbare Katalysatoren der Degradierung dienen.⁹⁰⁻
⁹² Interessanterweise wurde kürzlich ein kovalent reversibler PROTAC (YF135) mit einem substituierten Cyanacrylamid-*warhead* entwickelt.⁹³ Darüber hinaus befindet sich der KRAS^{G12D}-*Degrader* ASP3082 derzeit in einer klinischen Studie (NCT05382559).⁹⁴ Ähnlich wie der Ansatz von REVOLUTION MEDICINES stellt diese Technologie eine vielversprechende Strategie zur Bekämpfung von RAS-mutiertem Krebs dar und bietet ein innovatives Behandlungspotential.⁹⁵

Motivation und Zielsetzung

Aufgrund der maßgeblichen Rolle von KRAS in zellulären Prozessen und der Tumorentstehung bleibt KRAS ein attraktiver Ansatzpunkt für die gezielte Behandlung von KRAS-mutierten oder durch KRAS getriebenen Tumoren. Seit einem Jahrzehnt, beginnend mit der wegweisenden Entdeckung der SWIIP durch die Arbeitsgruppe um KEVAN SHOKAT, wurde die Inhibition der KRAS^{G12C}-Mutante durch niedermolekulare Verbindungen untersucht und optimiert. Dies führte in den Jahren 2021 und 2022 zur Zulassung von Sotorasib⁶⁷ und Adagrasib (**1**)⁶⁸ und damit zu einem Durchbruch in der Behandlung von KRAS^{G12C}-mutiertem Lungenkrebs.⁷¹ Angesichts der intensiven Erforschung der G12C-Variante sollte diese als Modellsystem dienen, um eine Plattform zu etablieren, die es ermöglicht, Ausgangspunkte für neuartige kovalente Inhibitoren zu generieren. Dazu wurde ein bereits bekanntes kovalentes Strukturmotiv, das in nahezu allen G12C-Inhibitoren vorhanden ist, ausgewählt und mit einem Alkin versehen, um eine Diversifizierung mittels Kupfer-katalysierter Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC) zu ermöglichen. Mithilfe eines plattformbasierten Systems sollten in einem Durchlauf 448 verschiedene Azide mit dem Alkin-Grundbaustein reagieren und ohne weitere Aufreinigung direkt in einem zellulären Assay auf ihre biologische Aktivität getestet werden, wodurch eine zeit- und ressourcensparende Generierung einer *Screening*-Bibliothek ermöglicht wurde.⁹⁶ Identifizierte Hits durchliefen eine Re-Synthese zur *Hit*-Validierung und weiteren Charakterisierung. Das Projekt sollte besonderen Wert auf die Etablierung eines robusten Proteinexpressions- und Kristallisationssystems legen, um letztendlich strukturelle Einblicke in die Ligandenbindung zu gewinnen und das rationale molekulare Design zu leiten, was die Entwicklung von Leitstrukturen aus den initialen Hits ermöglichen kann.

Neben der bekannten KRAS^{G12C}-Variante tritt bei 6 % der Lungenkrebspatienten auch die Punktmutation G13C auf, die bislang nahezu unerforscht ist und in der Literatur wenig Beachtung findet. Dies unterstreicht die Dringlichkeit der Entwicklung von Modulatoren, die gezielt auf die KRAS^{G13C}-Mutation abzielen, um Werkzeugmoleküle zu schaffen, die das biologische Verständnis der Rolle dieser Mutation in der Karzinogenese vertiefen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können als Grundlage für neue und innovative Behandlungsansätze für derartige Tumore dienen. Analog zur G12C-Mutation befindet sich das erworbene Cys13 im P-Loop und könnte somit ein potenzieller Angriffspunkt für kovalente Modulatoren darstellen. In dieser Arbeit sollten zwei verschiedene Ansätze zur kovalenten und selektiven Adressierung der noch weitgehend unerforschten G13C-Mutation verfolgt werden. Im Rahmen des ersten Projekts sollten auf Grundlage von GOEBEL *et al.* GDP-basierte Nukleotid-Analoga mit einem Linker- und Acrylamid-Motiv an der 2'- bzw. 3'-Position der Ribose modifiziert werden.⁹⁷ GOEBEL *et al.* diskutieren in ihrer Veröffentlichung, dass die Inhibitoren lediglich eine moderate kovalente Modifikation gegenüber dem erworbenen Cystein aufweisen. Zur Optimierung dieses Ansatzes sollten *Docking*-Studien das Design neuer, zyklischer statt linearer Linker lenken, um eine verbesserte Prä-Organisation und damit auch eine erhöhte Reaktivität der kovalenten Modulatoren zu erreichen. Diese sollten anschließend in biochemischen Untersuchungen charakterisiert werden, um den Erfolg dieses Ansatzes zu überprüfen. Ein zweiter Ansatzpunkt besteht in der zielgerichteten und kovalenten Adressierung von KRAS^{G13C} über die allosterische SWIIP. Es ist bekannt, dass neben der G12C-Variante auch andere Mutationen des Codons 12 (wie z.B. G12D⁷⁸, G12S⁸⁰ und G12R⁸¹) mithilfe eines Pyridopyrimidin-Grundgerüsts Mutanten-spezifisch in dieser Tasche adressiert werden können, wodurch das Protein inhibiert wird. In Anlehnung an dieses Konzept sollten erstmals Inhibitoren entwickelt werden, die dasselbe Grundgerüst wie die bekannten Verbindungen aufweisen, jedoch über einen verlängernden Linker kovalent an das erworbene Cys13 im P-Loop binden können. Geeignete Moleküle sollten zunächst durch kovalente *Docking*-Studien identifiziert und durch eine zu etablierende robuste Synthesestrategie hergestellt werden. Diese Synthesestrategie sollte aus Literatur-bekanntem Bedingungen⁷⁸ so abgewandelt werden, dass der gewählte Linker in die Verbindungen inkorporiert werden kann. In biochemischen und zellulären Studien sollten sie auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Darüber hinaus sollten strukturelle Einsichten bei Optimierungsversuchen helfen, die Bindungseigenschaften der neuartigen Inhibitoren zu verbessern.

Das Ziel dieser Dissertation war es, durch verschiedene Ansätze wie rationales Wirkstoffdesign und effiziente Hochdurchsatzverfahren neuartige, kovalent-bindende Inhibitoren für die Onkogene KRAS^{G12C} und KRAS^{G13C} zu entwickeln. Diese neuen Verbindungen sollten gezielt an diese Onkogen-Varianten binden und das bestehende Spektrum an möglichen therapeutischen Verbindungen erweitern. Die Entwicklung solcher Inhibitoren dient nicht nur dazu, das Verständnis für die biologische Funktion dieser Onkogene zu vertiefen, sondern eröffnet auch potenzielle Ansätze für innovative Behandlungsmöglichkeiten.

Neben KRAS spielt die Proteinkinase AKT eine zentrale Rolle in zellulären Signaltransduktionswegen und wirkt primär als negativer Regulator der Apoptose. Bislang war es schwierig, geeignete AKT-Inhibitoren für Tumore zu entwickeln, die eine Überaktivierung des AKT-Signalwegs aufweisen, da die spezifischen Einflüsse der verschiedenen AKT-Isoformen nur unzureichend verstanden waren. Für ein detaillierteres Verständnis sind hochspezifische, Isoform-selektive Sondenmoleküle essentiell, da sie Erkenntnisse über die zelluläre Lokalisation der Isoformen sowie detaillierte Einblicke in das Interaktom von AKT liefern können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, basierend auf Vorarbeiten von Dr. Lena Quambusch, AKT2-spezifische Sondenmoleküle genutzt, um ein robustes Pulldown-Protokoll in AKT2-exprimierenden Zellen zu etablieren. Ziel war es, die Selektivität der Sonden in zellulären Systemen mittels MS/MS-Studien zu überprüfen und potenzielle Interaktionspartner zu identifizieren. Hierzu sollte die Alkin-Funktionalität der Sondenmoleküle verwendet werden, um Reporter wie Fluorophore oder Affinitäts-Tags (z.B. Biotin) über eine Click-Reaktion gezielt einzubringen.

Ergebnisse

Entwicklung von neuen KRAS^{G12C} Inhibitoren mit Hilfe eines Fragment-basierten Ansatzes

Eine der häufigsten KRAS-Mutationen ist die G12C-Mutation, welche insbesondere bei Lungenkrebs eine prominente Rolle spielt. An dieser Mutante gelang erstmalig eine Adressierung von KRAS durch ein kovalent-bindendes Molekül, was zu den beiden zugelassenen Wirkstoffen Sotorasib (AMG510) (**4**)⁶⁷ und Adagrasib (MRTX849) (**1**)⁶⁸ führte. Der langwierige Prozess der Entdeckung potenzieller kovalenter Wirkstoffe und die Optimierung ihrer Bindungseigenschaften stellen bedeutende Herausforderungen in der Wirkstoffentwicklung dar. Deshalb stellt sich die Frage nach innovativen und zeitökonomischen Methoden zur Identifikation neuer kovalenter Inhibitoren.

Obwohl es für die KRAS^{G12C}-Mutation bereits zwei therapeutische Wirkstoffe zur Behandlung von Lungenkrebs gibt, kann es im Laufe der Behandlungen zu Zweitmutationen und somit zu einer möglichen Wirkstoffresistenz kommen.⁸³ Vor diesem Hintergrund kann es weiterhin interessant und hilfreich sein, Moleküle zu finden, welche kovalent die KRAS^{G12C}-Variante binden, sich aber strukturell von Sotorasib (**4**) bzw. Adagrasib (**1**) unterscheiden. Mit dem Ziel, möglichst schnell neuartige KRAS^{G12C}-Inhibitoren zu finden, bietet sich eine Hochdurchsatz-Diversifizierung eines bereits bekannten Strukturmotivs an. Eine solche Methodik wurde erstmalig von GEHRTZ *et al.* beschrieben, die kovalent reagierende initiale *Hit*-Strukturen über eine Click-Reaktion weiter modifiziert und somit diversifiziert haben.⁹⁶ Die Derivatisierung findet am Ende der Syntheseroute statt, um den Nutzen eines einzigen Intermediates zu maximieren.

Durchmusterung zur Identifikation von *Hit*-Molekülen

Als Ausgangspunkt für die Durchmusterung innerhalb dieses Projekts wurde ein Strukturelement gewählt, das häufig in KRAS-Inhibitoren vorzufinden ist.^{67, 68, 98} Das Piperazin-Motiv weist aufgrund der zwei Amin-Funktionalitäten zwei Exit-Vektoren auf. Einerseits wird das eine Amin mit einem MICHAEL-Akzeptor dekoriert, um den kovalent bindenden Charakter der zukünftigen Modulatoren zu erhalten. Andererseits wird das zweite Amin mit einem Alkin funktionalisiert (RL2473 (**5**)) (Abbildung 7). Eine Alkin-Funktionalität kann in vielen klassischen Reaktionen mit Übergangsmetall-Katalysatoren oder perizyklischen Bedingungen eingesetzt werden.⁹⁹⁻¹⁰¹ Dabei ist zu beachten, dass die Acrylamid-Funktionalität nicht in der Reaktion interferiert. Die CuAAC stellt hierbei eine geeignete Methode dar, da sie sowohl wasser- als auch lufttolerant ist.^{102, 103} Die hier präsentierte Methode der *High-Throughput-Nanomolar-Scale-Synthese* ermöglicht Reaktionen mit lediglich 300 nmol Startmaterial und funktionalisiert dieses effizient und ökonomisch. Darüber hinaus ermöglicht sie die Reduktion von Lösungsmitteln. Da die Synthese auf einem plattformbasierten Verfahren beruht, eignet sich diese Methode weniger zur Aufreinigung der Reaktionsgemische, weshalb rohe, nicht gereinigte Verbindungen weiterverwendet werden.⁹⁶ Das plattenbasierte Format erlaubt jedoch die frühzeitige Integration für weitere biologische Experimente, um Einblicke in die SAR zu gewinnen. Diese werden auch als NanoSAR bezeichnet (Abbildung 7).¹⁰⁴ In der Literatur sind bereits Methoden bekannt, welche klassische in der Medizinalchemie genutzte Reaktionen im Hochdurchsatzformat verwenden. So nutzt beispielsweise MERCK SHARP AND DOHME Amid-Kupplungen oder SUZUKI-MIYAJURA-Reaktionen auf diese Weise.^{102, 105}

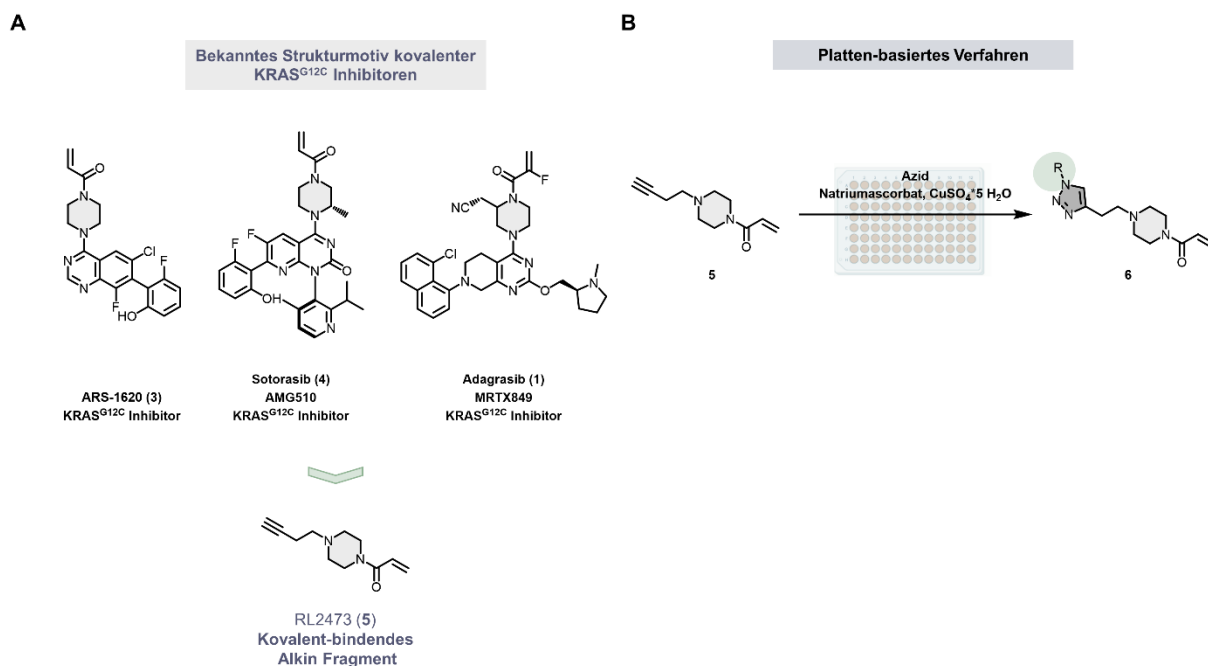


Abbildung 7. A: Drei literaturbekannte kovalent-bindende KRAS^{G12C}-Inhibitoren. Das gemeinsame Strukturmotiv ist grau hinterlegt. Daraus leitet sich das mit einem Alkin modifizierte Fragment RL2473 (**5**) ab. **B:** Schematische Darstellung der Platten-basierten Click-Reaktion von RL2473(**5**) mit der Azid-Bibliothek.²³

Die neu generierten Verbindungen werden unter Anwendung eines CellTiter-Glo (CTG)-Assays an NCI-H358-Zellen auf ihre zelluläre Potenz hin untersucht. Dabei werden die Zellen mit KRAS^{G12C}-Mutationen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ M und 1 μ M) mit den Verbindungen behandelt. Die Ergebnisse zur prozentualen Zellviabilität sind in Abbildung 8 aufgeführt.

² Die plattformbasierte Click-Reaktion wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nir London (Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel) entwickelt und zur Verfügung gestellt.

³ RL2473 (**5**) wurde initial von Dr. Lisa Goebel im Rahmen ihrer Masterarbeit synthetisiert.

A

	Zellviabilität [%]			
	5 μ M		1 μ M	
RL2473_Azid_145	56,24	\pm 4,34	104,97	\pm 6,28
RL2473_Azid_157	65,57	\pm 5,23	102,91	\pm 6,64
RL2473_Azid_322	62,6	\pm 2,93	89,04	\pm 3,54
RL2473_Azid_361	51,67	\pm 7,82	102,55	\pm 1,71
RL2473_Azid_382	49,96	\pm 1,16	78,49	\pm 3,02
RL2473_Azid_400	59,35	\pm 1,94	85,41	\pm 3,16

B

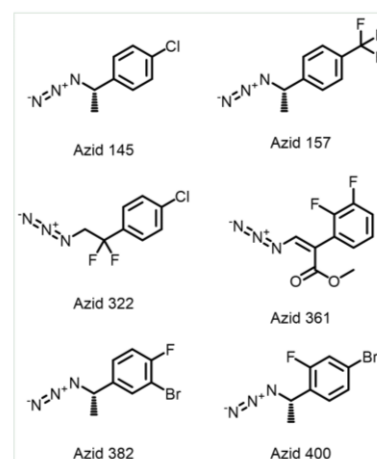


Abbildung 8. A: Tabelle der prozentualen Zellviabilität der erhaltenen *Hit*-Verbindungen gemessen auf H358-Zellen bei einer Konzentration von 1 und 5 μ M. **B:** Chemische Strukturen der Azide, welche in den *Hit*-Verbindungen vorkommen.⁴

In dieser Untersuchung konnten sechs Verbindungen als potenzielle *Hit*-Moleküle identifiziert werden. Diese *Hit*-Moleküle weisen insgesamt bemerkenswerte strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Alle sechs Verbindungen enthalten einen aromatischen Ring, der über eine kurze Verbrückung mit der Azid-Gruppe verbunden ist. Zudem weisen vier der sechs Moleküle (Azid 145, 157, 382, 400) eine Methylgruppe an der (*S*)-konfigurierten Methylenebrücke an der Verbrückung auf. Diese Strukturelemente könnten darauf hindeuten, dass sie eine signifikante Rolle bei der Bindung in der allosterischen Tasche des Zielproteins spielen. Die aromatischen Ringe sowie die Methylgruppe an der (*S*)-konfigurierten Methylenebrücke könnten wichtige Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen und so die Affinität sowie Spezifität der Moleküle gegenüber der allosterischen Bindungsstelle beeinflussen.

⁴ Die plattformbasierte Click-Reaktion wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nir London (Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Die initialen Viabilitätsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Lisa Goebel und M.Sc. Sandra Koska (AG Rauh, TU Dortmund) durchgeführt.

Hit-Validierung mittels der CovClick-Methode

Eine Herangehensweise, um die identifizierten *Hit*-Verbindungen zu validieren, stellt der Ansatz der kovalenten *in situ* Click-Chemie (*Covalent in situ Click-chemistry*, *CovClick*) dar. Ziel dieser Methode ist es, dass innerhalb der Bindungstasche des Proteins, zwei Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden, welche miteinander reagieren können und so einen neuen Liganden bilden. Hierbei selektiert die Beschaffenheit der Bindungstasche die bindenden Fragmente, sodass ein passgenauer und affiner Wirkstoff entstehen kann.

Das Prinzip der Zielprotein-kontrollierten Synthese (engl. *target-guided synthesis*, TGS)¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ wurde erstmalig von RIDEOUT *et al.* beschrieben.^{109, 110} Im Unterschied zur kinetisch-gesteuerten Zielprotein-kontrollierten Synthese (engl. *kinetically controlled target-guided synthesis*),¹¹¹ welche hochreaktive Reagenzien verwendet und somit unerwünschte Nebenreaktionen begünstigt werden, setzt die *in situ* Click-Chemie auf die bioorthogonale Reaktion zwischen Aziden und Alkinen. Diese reagieren in einer [1,3]-dipolaren Cycloaddition irreversibel miteinander zu Triazolen.^{112, 113} Es ist hervorzuheben, dass die Reaktanten im biologischen System inert sind und keine zusätzlichen Katalysatoren benötigen. Die Reaktion der beiden Reaktanten ist zwar langsam, wird jedoch durch die räumliche Nähe, vermittelt durch die Bindungstasche des Zielproteins, beschleunigt.¹¹³ Aus diesem Grund eignet sich diese Methode besonders für den genannten Zweck. Im Falle des *CovClick*-Prinzips reagiert ein Sonden-Molekül mit dem Protein und modifiziert das gewünschte Cystein in der Bindungstasche kovalent. Anschließend reagiert die Alkin-Gruppe des Sonden-Moleküls mit einem Azid-Fragment, unter Ausbildung des Triazols. Dabei sollten die *Hit*-Fragmente eine ausreichende Affinität zur Bindungstasche aufweisen. Die Auswertung des Screens erfolgt durch massenspektrometrische Analysen.

Ergebnisse der CovClick-Methode⁵

Ziel dieser Herangehensweise war es, dass die gefunden *Hit*-Azide mit Hilfe dieser Methode validiert werden. Entscheidend ist hierbei, dass aufgrund der Affinität der Moleküle zum Zielprotein nur die *Hit*-Azide eine signifikante Reaktivität zeigen sollten und somit diese im Vergleich zu anderen Aziden selektiert werden können. Für das *Screening* wird in einem ersten Schritt das Protein KRAS^{G12C} vollständig mit dem Alkin-Baustein (**5**) kovalent modifiziert und anschließend von dem überschüssigen Molekül über eine Gelfiltration befreit. Dies soll vermeiden, dass verbliebenes Alkin, welches nicht an das Protein gebunden ist, mit den Aziden reagiert und dann anschließend erst an KRAS^{G12C} bindet. Durch das Vormodifizieren, soll das Alkin-Fragment (**5**) in der Bindetasche vororientiert sein. Im zweiten Schritt kann das Azid in der Bindetasche ebenfalls binden und durch die räumliche Nähe mit dem Alkin-Baustein reagieren (Abbildung 9).

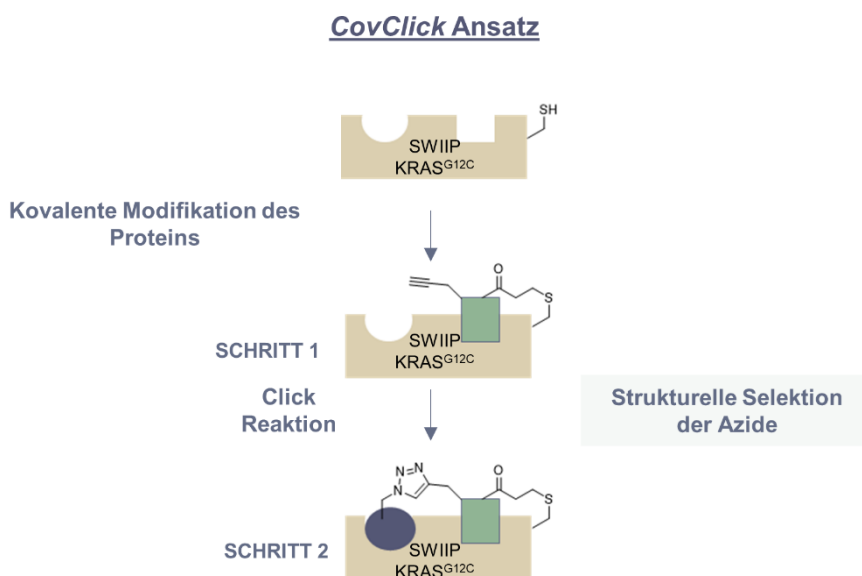


Abbildung 9. Schematischer Aufbau des CovClick-Ansatzes. Das Alkin-Fragment bindet kovalent an das Cys12 der KRAS^{G12C}-Variante. Nach dem ersten Modifikationsschritt wird das Protein über eine Gelfiltration gereinigt. Anschließend erfolgt eine Inkubation des vor-modifizierten Proteins mit den Azid-Bausteinen. Hierbei soll die Bindetasche eine Selektion der Azide vermitteln.

⁵ Das KRAS^{G12C}-Protein wurde von Andreas Arndt exprimiert und gereinigt.

Für das Experiment wurde das Azid in zehnfachem Überschuss zu der Proteinlösung gegeben. Nachdem in dem Click-Mix die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) erfolgt war (Farbumschlag zu grün beobachtbar), wurde der Mix zu der Proteinlösung gegeben und das Gemisch für 72 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer erneuten Auswertung der Ergebnisse konnte bei einigen erfolgreich verlaufenden Click-Reaktionen eine Massenverschiebung festgestellt werden (Abbildung 11). Dabei fiel auf, dass die Click-Reaktion in einigen Fällen nicht vollständig ablief. Dies könnte an der Selektion der Azide innerhalb der Bindetasche liegen oder daran, dass die Azide unterschiedlich starke Reaktivitäten aufweisen.

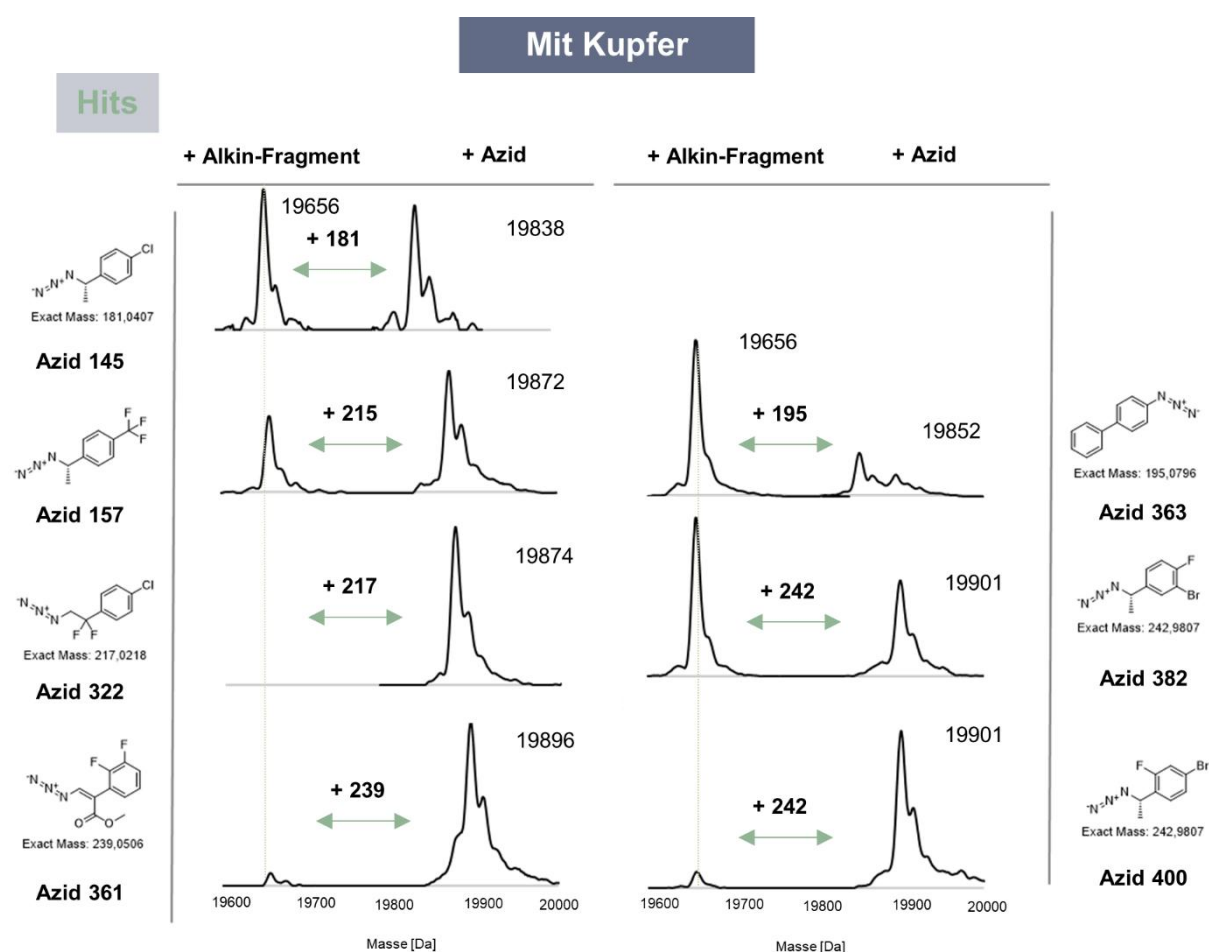


Abbildung 11. Massenspektrometrische Analyse der gefundenen *Hit*-Azide mit dem vor-modifizierten KRAS^{G12C}. Die Inkubation erfolgte in zehnfachem Überschuss in TRIS-Puffer pH 7, bei 37 °C für 72 h (mit Kupfer).

Um zu kontrollieren, ob die Beschaffenheit der Bindungstasche die Azide hinsichtlich ihrer Passgenauigkeit selektieren kann und somit die Ergebnisse aus dem zellulären Assay bestätigen kann, wurden auch Azide in diesem System getestet, welche zuvor nicht als *Hit*-Azide identifiziert wurden.

Mit Kupfer

Kontrollen

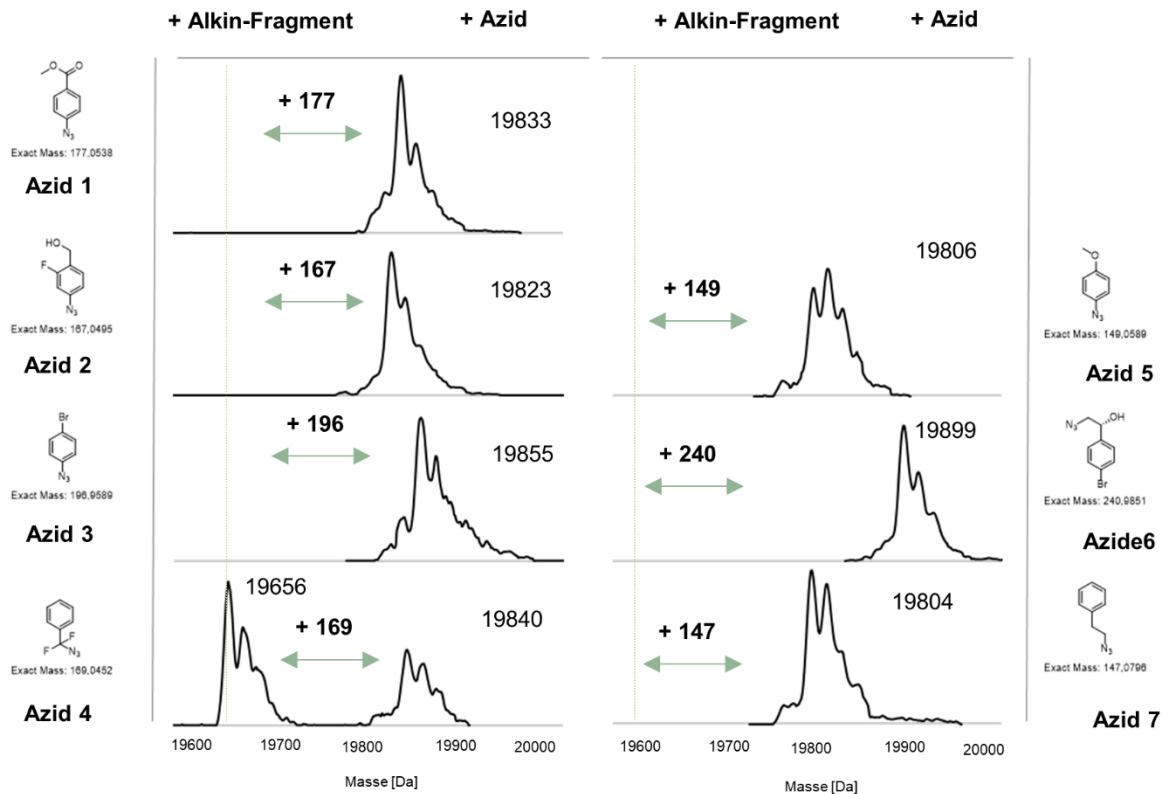


Abbildung 12. Massenspektrometrische Analyse der Kontroll-Azide mit dem vor-modifizierten KRAS^{G12C}. Die Inkubation erfolgte in zehnfachem Überschuss in TRIS-Puffer pH 7, bei 37 °C für 72 h (mit Kupfer).

Aus Abbildung 12 geht dennoch hervor, dass auch die als nicht-Hits identifizierten Azide eine Reaktion mit dem Protein-Alkin Komplex eingehen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Affinität des kleinen Alkin-Fragments nicht ausreichend hoch ist, sodass es wirklich in der SWIIP lokalisiert ist. Das mutierte Cystein, welches kovalent modifiziert wird, ist sehr Lösungsmittel exponiert. Hierdurch liegt der Verdacht nah, dass sich das Molekül auch außerhalb des Proteins befinden kann und die Azide dadurch nicht durch das Protein selektiert werden können. Das Design eines höher affinen Fragments könnte hierbei von Vorteil sein. Eine weitere Fehlerquelle könnte der Zusatz von Cu(II)SO₄ darstellen. Dies könnte bewirken, dass das Protein nicht mehr in seiner nativen Struktur vorliegt und es somit nicht zu einer Bindung der Azide in der SWIIP kommen kann. Um dies auszuschließen, könnte ein Assay unternommen werden, welcher KRAS auf seine Funktionalität hin untersucht (GEF-Austausch Assay).

Aufgrund der hier gefundenen Ergebnisse wurde diese Herangehensweise verworfen, da nicht sichergestellt werden konnte, dass die Reaktion unter den gewählten Bedingungen selektiv durch das Protein vermittelt wird und ausschließlich nach der Bindung der Fragmente innerhalb der SWIP verläuft, sodass es zu einer strukturellen Selektion der Azide kommt.

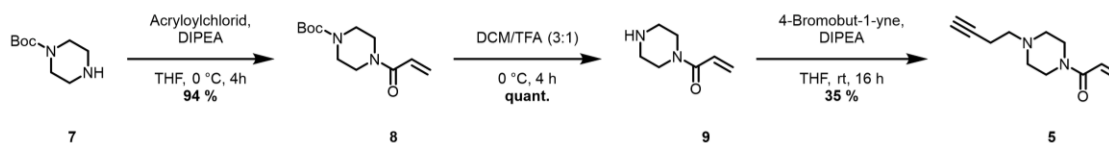
Re-Synthese der *Hit*-Moleküle

Zur Validierung der identifizierten *Hits* (**6 a-f**) ist es erforderlich, diese in einem neuen Syntheseverfahren nachzubilden, zu reinigen und ihre Identität durch MS- und NMR-Analytik zu charakterisieren und zu bestätigen.

In einem ersten Synthesestrang wurde das Alkin-Fragment (**5**) erneut hergestellt. Dazu wurde Boc-geschütztes Piperazin (**7**) in THF unter basischen Bedingungen mit Acryloylchlorid bei niedrigen Temperaturen umgesetzt. Hierbei greift das sekundäre, basische Amin in einer S_N2 -Reaktion das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Säurechlorids an, wobei das Chlorid abgespalten wird und schlussendlich das Amid aufgebaut wird (**8**). Die anschließende Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte unter TFA-sauren Bedingungen. In der Decarboxylierungsreaktion wird die Boc-Schutzgruppe als Isobuten und Carbamatsäure, welches sich weiter zu CO_2 zersetzt, und das Amin freigesetzt. Das resultierende freie Amin (**9**) wurde daraufhin ebenfalls unter basischen Bedingungen mit Alkinbromid modifiziert, wodurch das gewünschte bifunktionale, kovalent bindende Alkin-Fragment (**5**) entstand. In einem weiteren Schritt wurde dieses im Kolben einer Kupfer-katalysierten Click-Reaktion mit den entsprechenden Aziden umgesetzt. Dabei konnten die gewünschten *Hit*-Verbindungen (**6 a-f**) mit hoher Reinheit und zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden (Abbildung 13).

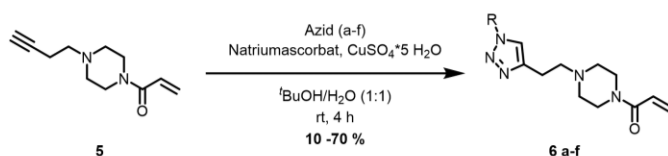
A

Synthese des Alkin-Bausteins



B

Re-Synthese der Hit-Verbindungen (Click-Chemie)



C

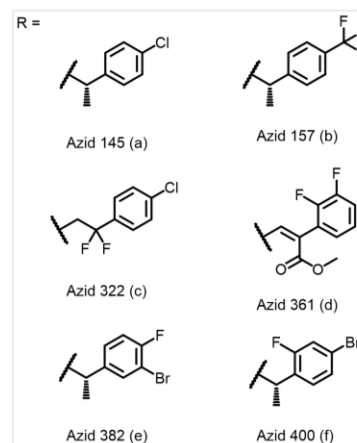


Abbildung 13. A: Drei-Schritt Synthese des Alkin-Bausteins (**5**). Ausgehend von Boc-Piperazin (**7**) kann nach Reaktion mit Acryloylchlorid und der anschließenden sauren Entschützung im letzten Schritt nach nukleophiler Substitution der Baustein (**5**) erhalten werden. **B:** Re-Synthese der erhaltenen *Hit*-Verbindung (**6 a-f**) über eine Click-Reaktion. **C:** Chemische Strukturen der Reste der korrespondierenden Azide (**a-f**).

Massenspektrometrische Untersuchungen

Um den kovalenten Bindungscharakter der neuen Verbindungen nachzuweisen, sollen Massenspektrometrie (MS)-Studien mit dem aufgereinigten Protein KRAS^{G12C} durchgeführt werden. Dieses Proteinkonstrukt zeichnet sich dadurch aus, dass alle vorhandenen Cysteine - bis auf das zu adressierende Cys12 - mutiert wurden. Durch diese Modifikation kann mithilfe von MS-Studien nachgewiesen werden, dass es sich bei der kovalenten Modifikation um das gewünschte Cys12 handelt. Für diese Untersuchungen wurde das Protein 24 h bei pH 9,5 und rt mit einem zehnfachen Überschuss der Zielmoleküle inkubiert (Abbildung 14).

Ergebnisse

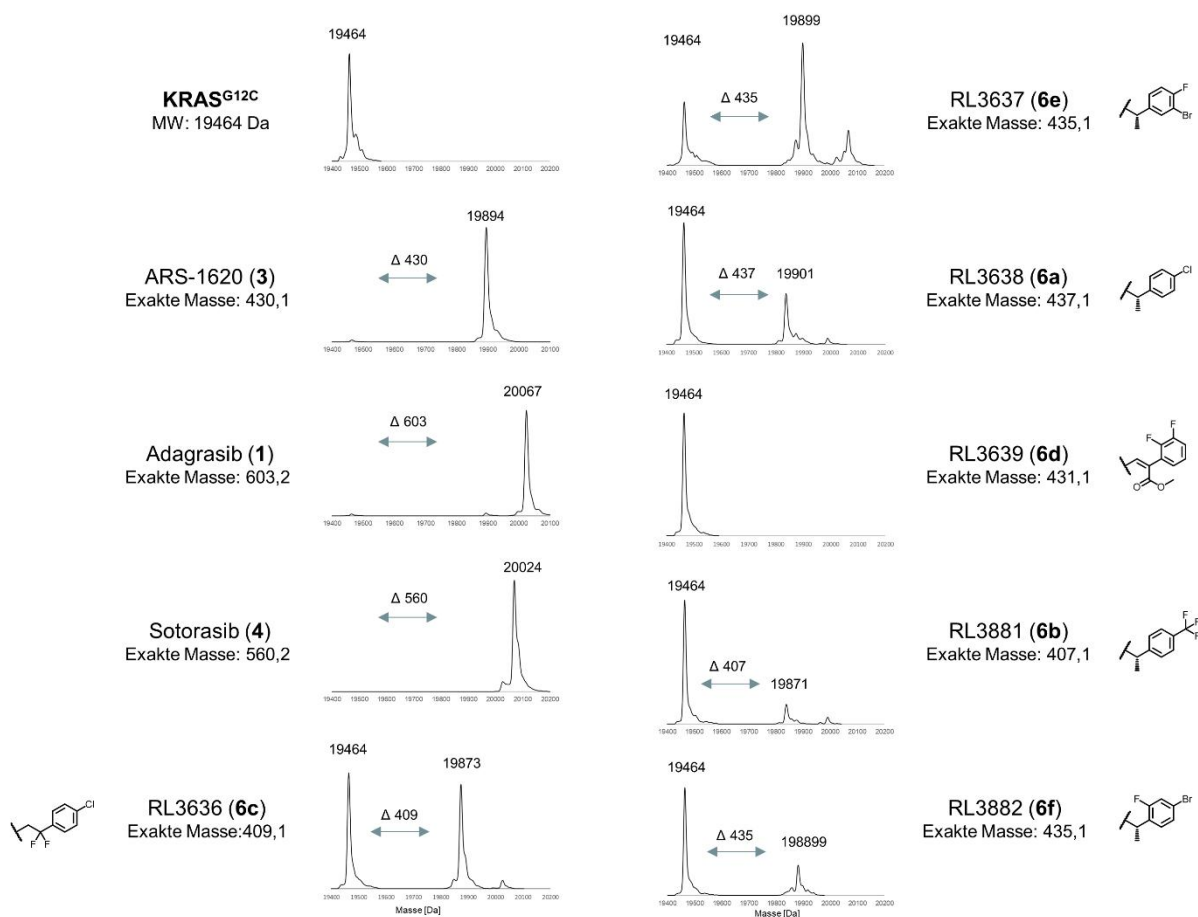


Abbildung 14. Massenspektrometrische Analysen der Referenzverbindungen ARS-1620 (**3**), Sotorasib (**4**) und Adagrasib (**1**) sowie den hier gefundenen *Hit*-Verbindungen (**6 a-f**) bei pH 9,5 im 10-fachen Überschuss, rt, 24 h mit KRAS^{G12C}.

Hierbei wurde ersichtlich, dass alle der gefundenen *Hit*-Strukturen kovalent KRAS^{G12C} modifizieren. Da es sich bei dem Proteinkonstrukt um die *Cys-light*-Variante handelt, ist davon auszugehen, dass das gewünschte Cys12 kovalent adressiert wurde. Besonders gut schnitten in diesem Experiment die drei Inhibitoren RL3636 (**6c**), RL3637 (**6e**) und RL3638 (**6a**) ab, welche eine prozentuale Modifikation von über 50 % bis hin zu ca. 70 % erreichten. Dieses Experiment bestätigt den gewünschten kovalenten Bindungsmodus der neuartigen Verbindungen. Ähnlich wie bei den zellulären Studien wurde auch hier eine verringerte Modifikationsrate im Vergleich zu den drei etablierten Inhibitoren ARS-1620 (**3**) Sotorasib (**4**) und Adagrasib (**1**) erreicht.

Zelluläre Charakterisierung der neuen Substanzbibliothek

Nach der erneuten Synthese der Verbindungen wurden diese in einem CTG-Assay unter Verwendung von NCI-H358-Zellen analysiert. Hierbei erfolgte die Aussaat der Zellen in eine 384-well-Platte, gefolgt von einer 96-stündigen Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren in Konzentrationsbereichen von 0,1 nM bis 30 μ M. DMSO diente als Negativkontrolle, während 30 μ M des zytotoxischen Multikinase-Inhibitors Staurosporin als Positivkontrolle verwendet wurden.^{114, 115} Die biochemische Analyse isolierter Proteine ermöglicht eine rasche Charakterisierung von Inhibitoren, während zelluläre Modelle eine umfassendere Untersuchung komplexer biologischer Parameter bieten, die für die präklinische Forschung relevant sind. Zu diesen Parametern gehören unter anderem die Membrangängigkeit der Verbindungen sowie die Wechselwirkungen und Regulationsmechanismen innerhalb verschiedener Signalwege und Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle. Zudem lassen sich niedermolekulare Verbindungen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und potenziellen *Off-Target*-Effekte bewerten. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der CTG-Assay verwendet, um die Auswirkungen der Inhibitoren auf das Wachstum einer humanen Krebszelllinie mit KRAS-Mutation zu untersuchen. Die Zellviabilität wurde durch Messung des ATP-Gehalts nach Zellyse bestimmt. In diesem Verfahren wird Luciferin durch eine ATP-abhängige Luciferase in lumineszierendes Oxyluciferin umgewandelt, wodurch ein Lumineszenzsignal erzeugt wird, das direkt proportional zur ATP-Konzentration in den Zellen ist. In Abbildung 15 sind die EC_{50} -Werte der neuen Verbindungen, des initialen Alkin-Fragments sowie Referenzverbindungen aufgeführt.

A

CTG Assay H358			
EC ₅₀ [µM]			
Alkin-Fragment	RL2473 (5)	≥ 30	± 0
Hit-Verbindungen	RL3636 (6c)	≥ 30	± 0
	RL3637 (6e)	12,05	± 3,47
	RL3638 (6a)	24,56	± 6,65
	RL3639 (6d)	≥ 30	± 0
	RL3881 (6b)	16,73	± 5,31
	RL3882 (6f)	19,41	± 7,71
Referenzen	ARS-1620 (3)	7,54	± 0,66
	Sotorasib (4) (AMG510)	0,58	± 0
	Adagrasib (1) (MRTX849)	0,01	± 0

B

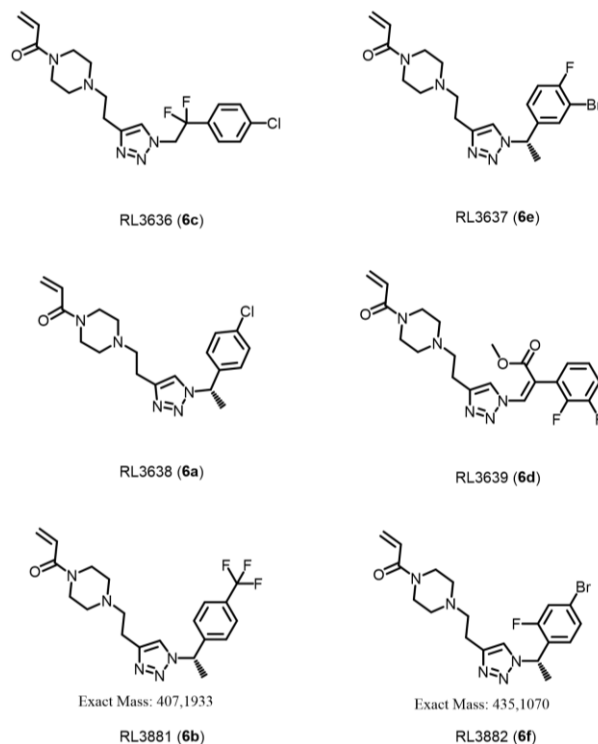


Abbildung 15. A: Übersichtstabelle der bestimmten EC₅₀-Werte gefundenen *Hit-Verbindungen* und Referenz-Verbindungen. **B:** Chemische Strukturen der *Hit-Verbindungen*.

Es ist ersichtlich, dass das un-modifizierte Alkin-Fragment (**5**) innerhalb der Assay-Grenze keinen Effekt zeigt (EC₅₀ ≥ 30 µM). Der KRAS-Inhibitor ARS-1620 (**3**) zeigt einen EC₅₀-Wert von 7,54 µM. Die von der FDA zugelassenen Inhibitoren Sotorasib (AMG510) (**4**) und Adagrasib (MRTX849) (**1**) zeigen EC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich. Im Vergleich dazu zeigen RL3636 (**6c**) und RL3639 (**6d**), ähnlich wie das Alkin-Fragment RL2473 (**5**), EC₅₀-Werte außerhalb der Assay-Grenze (EC₅₀ ≥ 30 µM). Im Gegensatz dazu zeigen die neuen Verbindungen RL3637 (**6e**), RL3638 (**6a**), RL3881 (**6b**) und RL3882 (**6f**) EC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich, wobei RL3637 (**6e**) die beste zelluläre Potenz mit 12 µM aufweist. Auffällig hierbei ist, dass die Molekülteile, welche von dem Azid-Baustein stammen, strukturell ähnlich sind. Zum einen verfügen alle über eine Methylgruppe an dem S-konfigurierten CH₂-Linker, gefolgt von einem aromatischen Phenyl-Rest, der unterschiedlich mit Halogenen modifiziert ist. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass dieses Strukturmotiv wichtig für die zelluläre Potenz ist und dieser Rest wichtige Wechselwirkungen innerhalb des Proteins eingeht, welche verantwortlich für die biologische Aktivität sind.

Um ein verbessertes Verständnis hinsichtlich ihrer Wirkung auf nachgeschaltete KRAS-Effektoren in H358-Zellen zu erlangen, wurden die zwei besten Verbindungen RL3637 (**6e**) und RL3881 (**6b**) in Western-Blot-Analysen untersucht. Als Referenz diente der klinisch zugelassene Inhibitor Adagrasib (MRTX849) (**1**). Hierzu wurden die Zellen mit den Inhibitoren in einer Konzentrationsreihe von 0,3 – 5 μM für 24 h behandelt.

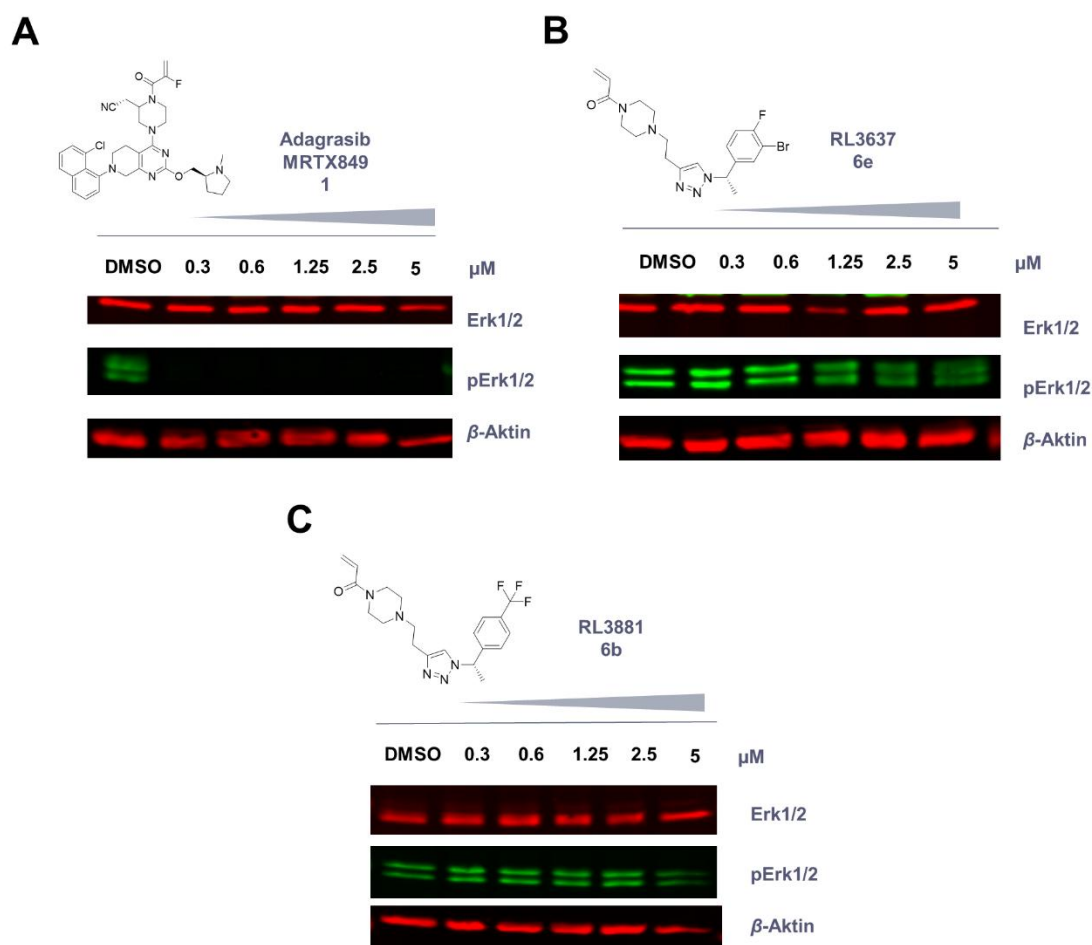


Abbildung 16. Immuno-Blots von drei KRAS^{G12C}-Verbindungen. **A:** Dosis-abhängige Darstellung der Intensitäten der Phospho-Spezies von Erk1/2 im Vergleich zu den nicht-Phospho-Spezies nach Behandlung mit Adagrasib (**1**). **B:** Dosis-abhängige Darstellung der Intensitäten der Phospho-Spezies von Erk1/2 im Vergleich zu den nicht-Phospho-Spezies nach Behandlung mit RL3637 (**6e**). **C:** Dosis-abhängige Darstellung der Intensitäten der Phospho-Spezies von Erk1/2 im Vergleich zu den nicht-Phospho-Spezies nach Behandlung mit RL3881 (**6b**).

Es konnte festgestellt werden, dass Adagrasib (**1**) bereits bei einer sehr niedrigen Konzentration von 0,3 μM eine signifikante Reduktion des Phosphorylierungssignals von Erk1/2 bewirkt. Im Gegensatz dazu zeigte der Inhibitor RL3637 (**6e**) erst bei einer Konzentration von 1,25 μM eine leichte Reduktion der *downstream*-Phosphorylierung, welche mit steigender Konzentration (2,5 und 5 μM) zunimmt (Abbildung 16). Jedoch führt RL3637 (**6e**) bei den gemessenen Konzentrationen nicht zu einem vollständigen Ausbleiben der Signalweiterleitung, wie es bei Adagrasib (**1**) der Fall ist. Im Fall von RL3881 (**6b**) wurde erst bei einer Konzentration von 5 μM eine leichte Reduktion des Phospho-Signals bei den *downstream*-Effektoren Erk1/2 beobachtet. Die hier erzielten Ergebnisse der drei verwendeten Inhibitoren stimmen mit den zuvor bestimmten EC_{50} -Werten überein. Für den zugelassenen Inhibitor Adagrasib (**1**) liegt der EC_{50} -Wert im submikromolaren Bereich, weshalb bereits bei der niedrigsten verwendeten Konzentration von 0,3 μM keine vollständige Inhibition der Phosphorylierung im Western Blot detektierbar ist. RL3637 (**6e**) scheint im Vergleich zu RL3881 (**6b**) eine verbesserte Effektivität aufzuweisen, obwohl die EC_{50} -Werte der beiden Inhibitoren im gleichen Bereich liegen (Abbildung 16).

Im Vergleich zu den bekannten KRAS-Inhibitoren zeigen die neu identifizierten Verbindungen eine geringere zelluläre Potenz. Diese Moleküle sind jedoch lediglich initiale Treffer mit relativ geringem Molekulargewicht und wurden bisher keiner medizinisch-chemischen Optimierung unterzogen. Die Halogenatome an der aromatischen Einheit könnten als Exit-Vektoren dienen, um die neuen Verbindungen durch die Addition weiterer funktioneller Gruppen zu erweitern und somit zu optimieren.

Proteinkristallisation⁶

Wie bereits zuvor erwähnt, stellen die in diesem Projekt generierten Verbindungen einen wertvollen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger KRAS^{G12C}-Inhibitoren dar. Dennoch sollten die erhaltenen Moleküle weiter optimiert werden. Um das Molekül weiter zu modifizieren, bieten sich Halogene als mögliche Exit-Vektoren an. Um den Optimierungsprozess rational zu gestalten, sind Ko-Kristallstrukturen des Zielproteins im Komplex mit dem Inhibitor von großer Hilfe. Diese Strukturen bieten einen strukturellen Einblick in die Ligandenbindung und unterstützen das rationale Wirkstoffdesign. Für die erfolgreiche Durchführung von Kristallisationsexperimenten werden große Mengen des gewünschten Proteins (KRAS^{G12C} *Cys-light*) in hoher Reinheit benötigt. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Vincent Wagner (Sommersemester 2023) eine in der AG RAUH bereits etablierte Expressions- und Reinigungsmethode zur Gewinnung von KRAS^{G12C}-*Cys-light* optimiert. Beim ersten Expressionsversuch kam es zu einer erhöhten Bildung von Inklusionskörpern, was in einer geringen Proteinausbeute von 11 mg (50 l Expressionsvolumen) resultierte. Um dies zu verhindern, wurde vor der Induktion mit Isopropyl- β -*D*-thiogalactopyranosid (IPTG) die Expressionskultur auf 20 °C heruntergekühlt, um eine zu schnelle Expression und Fehlfaltung des Zielproteins zu vermeiden. Zusätzlich wurde von LB- auf das nährstoffreichere TB-Medium umgestellt.

Da erste Kristallisationsversuche unter literaturbekannten Bedingungen für KRAS^{G12C} mit dem Liganden Adagrasib (**1**) (32 % PEG 4K, 0,1M NaOAc, 8 % 2-Propanol, 20 °C) scheiterten, wurde die Proteinreinigung um eine Ionenaustauschchromatographie (IEX) ergänzt. Verbleibende Verunreinigungen können die Kristallisation des Proteins behindern. Das Protein wurde nach dem bereits etablierten Reinigungsprotokoll aufgereinigt, welches um die IEX erweitert wurde. Hierzu wurde das Zellpellet zunächst über eine Nickelaffinitätschromatographie (Ni-AC) aufgetrennt. Der vorhandene His-Tag wurde anschließend mit Hilfe einer *tobacco etch virus* (TEV)-Protease abgespalten.

⁶ Teile dieses Abschnitts wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Vincent Wagner angefertigt.

Nach einer Dialyse über Nacht wurde das Proteingemisch erneut über eine Ni-AC gereinigt, um die TEV-Protease abzutrennen. Anschließend erfolgte der neu hinzugefügte Reinigungsschritt der IEX. Der finale Reinigungsschritt bestand aus einer Größenausschlusschromatographie (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) und lieferte das Protein in optimierter Reinheit und in einer deutlich verbesserten Ausbeute von 60 mg (15 l Expressionsvolumen).

Wie in der Literatur beschrieben, wurde das aus der Expression erhaltene Protein für die Verbindungen Adagrasib (**1**), RL3636 (**6b**) und RL3882 (**6f**) in einer Konzentration zwischen 15 und 50 mg/ml mit einem zwei- bis 15-fachen Überschuss des Inhibitors versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das kovalent modifizierte Protein über eine SEC nochmals aufgereinigt, um es von dem Überschuss des Inhibitors und möglichen Aggregaten zu befreien. Dies führte zu einer homogenen Proteinlösung. Außerdem wurde in diesem Schritt der Puffer mit einem neutralen pH-Wert ausgetauscht, da die Modifizierung bei pH 9,5 stattgefunden hatte.

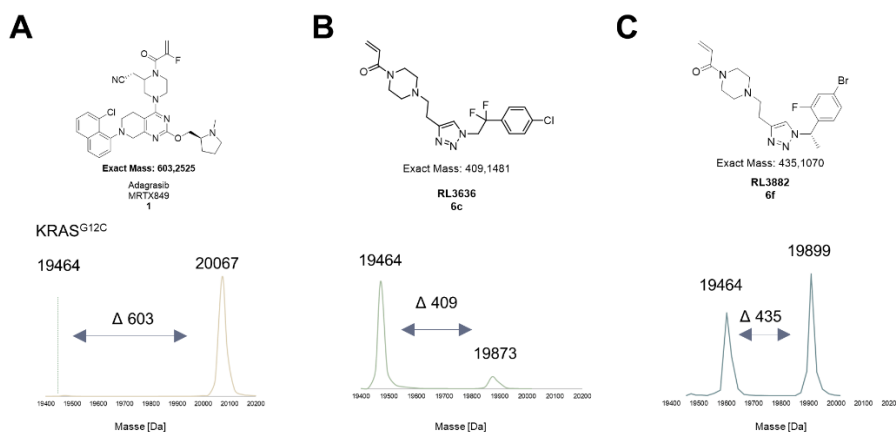


Abbildung 17. Kovalente Modifikation des KRAS^{G12C}-Proteins mit einem zwei- bis 15-fachen Überschuss der Verbindung bei pH 9,5 bei rt für 24 h. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung über eine SEC. **A:** MS-Experiment mit Adagrasib (**1**). **B:** MS-Experiment mit RL3636 (**6c**). **C:** MS-Experiment mit RL3882 (**6f**).

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, konnte lediglich für Adagrasib (**1**) eine vollständige Modifikation erreicht werden. Während KRAS^{G12C} mit der Verbindung RL3636 (**6c**) nur sehr gering kovalent modifiziert wurde, konnte mit RL3882 (**6f**) eine Modifikationsrate von ca. 60 % erzielt werden.

Die unmodifizierte und modifizierte Proteinspezies konnte über eine SEC nicht voneinander getrennt werden. Demnach wurden in den Kristallisationsansätzen für die neuen Verbindungen **6c** und **6f** nicht homogene Proteinlösungen verwendet.

Sowohl für das kommerziell erworbene Adagrasib (**1**) als auch für RL3636 (**6c**) und RL3882 (**6f**) wurden initiale Screens (JCSG Core I-III und PACT) bei 20 °C unter häufig vorkommenden Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Gefundene vielversprechende Bedingungen wurden in *Fine Screens* weiter optimiert und für alle drei Verbindungen **1**; **6c** und **6f** konnte kristallines Wachstum beobachtet werden (Abbildung 18).

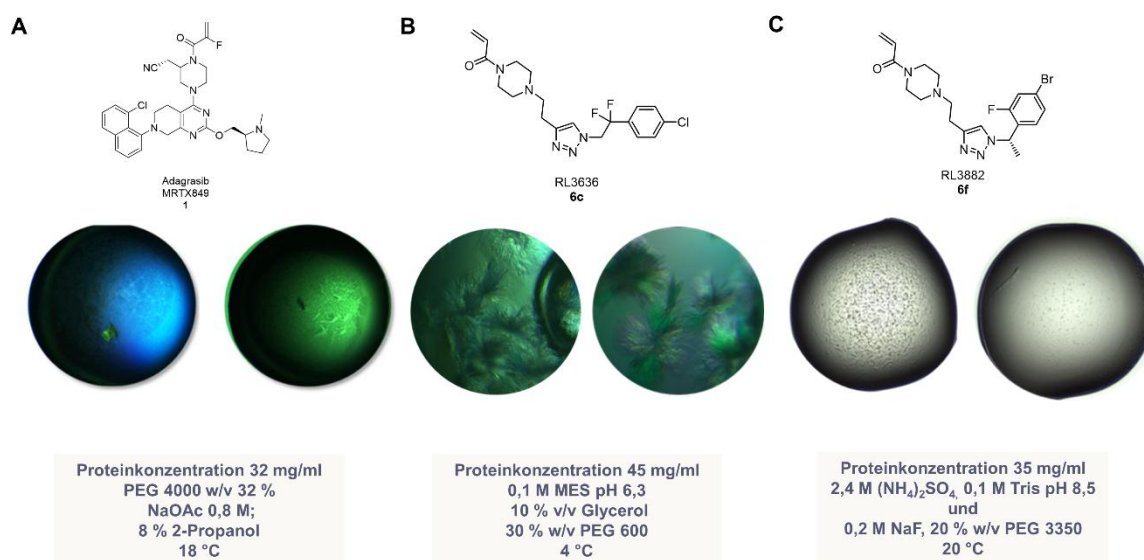


Abbildung 18. Kristallisations-Bedingungen von KRAS^{G12C} im Komplex mit Adagrasib (**1**) (**A**), RL3636 (**6c**) (**B**) und RL3882 (**6f**) (**C**).

Die erhaltenen Nadelcluster im Fall von RL3636 (**6c**) zeigten am hauseigenen Röntgendiffraktometer eine Proteindiffraktion bis zu 4 Å, sodass sowohl diese als auch Kristalle aus den Nadelclustern für weitere Messungen an der *Swiss Light Source* (SLS) des Paul Scherrer Instituts in Villigen (Schweiz) vorbereitet wurden (Abbildung 19).

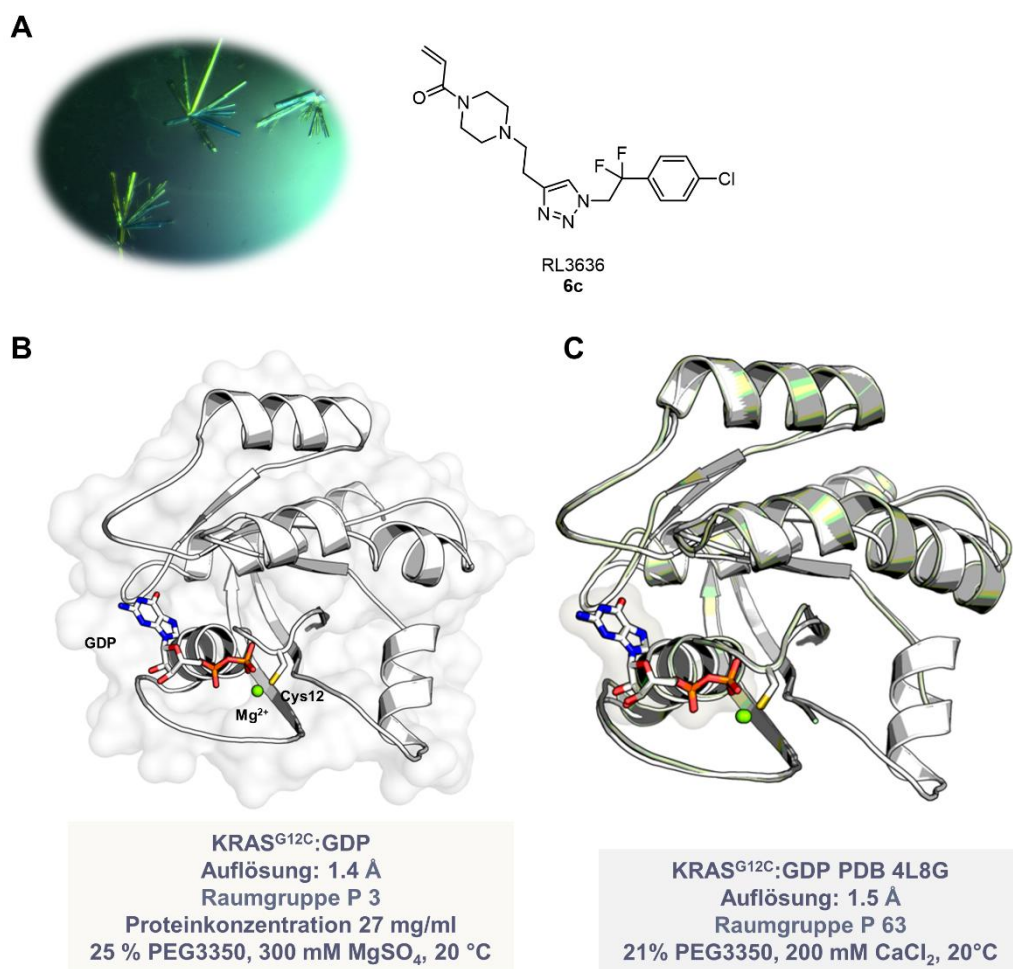


Abbildung 19. A: Nadelcluster von KRAS^{G12C} vermeintlich im Komplex mit RL3636 (**6c**). **B:** In dieser Arbeit erhaltene Kristallstruktur von KRAS^{G12C} im GDP-gebundenen Zustand. **C:** Überlagerte Strukturen der hier erhaltenen Kristallstruktur (grau) mit der literatur-bekannten Struktur PDB 4L8G (grün).

Mit den erhaltenen Kristallen konnte ein Datensatz mit exzellenter Auflösung von 1,4 Å generiert werden. Bedauerlicherweise zeigte die resultierende Struktur, dass der gewünschte Ligand nicht in der allosterischen *Switch-II*-Tasche kovalent an Cys12 gebunden ist. Die Mutation zum Cystein an Position 12 ist jedoch klar erkennbar. Ein Vergleich der erhaltenen GDP-gebundenen Struktur mit einer in der Literatur beschriebenen Kristallstruktur (PDB 4L8G) desselben Proteins zeigt eine nahezu vollständige Übereinstimmung. In beiden Strukturen ist Cys12 in gleicher Orientierung zu finden.

Allerdings ist in der in dieser Arbeit erhaltenen Struktur eine zusätzliche Helix sichtbar, welche sich in der *Switch-I*-Region befindet (Abbildung 19).⁷ Da in der erhaltenen Struktur nicht die Verbindung **6c** in der SWIIP gefunden werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch *Soaking*-Experimente durchgeführt. Dabei wird der Inhibitor über fünf Tage erst nach dem Wachstum der Proteinkristalle zugegeben. Unter den Bedingungen 25 % PEG3350, 100 mM MgSO₄ und einer Proteinkonzentration von 27 mg/ml konnten schlussendlich Kristalle erhalten werden. Von diesen konnte eine Proteinkristallstruktur mit einer Auflösung von 1,5 Å erhalten werden. Auch in dieser Struktur konnte keine Bindung des Liganden in der allosterischen Tasche nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine Elektronendichte an Cys12 beobachtet, was auf eine kovalente Modifikation dieser Seitenkette durch den Inhibitor hindeuten könnte. Der Inhibitor ist dabei nicht innerhalb der SWIIP gebunden, sondern modifiziert das Cys12 von außen, da dieses lösungsmittel-exponiert vorliegt. Dies kann darauf hindeuten, dass die Verbindung noch keine ausreichende Affinität besitzt, was in der Zukunft optimiert werden sollte (Abbildung 63).

Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projekts war es, die von GEHRTZ *et al.* beschriebenen Verfahren auf KRAS^{G12C} anzuwenden.⁹⁶ Dazu wurden bekannte Bindungsmotive verwendet und mit einer Alkin-Gruppe modifiziert, die eine Derivatisierung mittels der CuAAC mit einer Vielzahl chemisch diverser Azide ermöglichte. In nachfolgenden zellulären Assays konnten sechs *Hits* identifiziert werden, was einer Trefferquote von 1,4 % entspricht. Zur Validierung der Treffer sollte die *CovClick*-Methode angewendet werden, um affin-bindende Motive aufgrund der Eigenschaften der Bindungstasche zu selektieren. In Ansätzen ohne Zugabe von Kupfer konnte keine Reaktion mit dem Alkin festgestellt werden. Erst nach Zugabe von Kupfer und einem Reduktionsmittel konnten in MS-Analysen entsprechende Massenverschiebungen beobachtet werden.

⁷ Die Proteinstruktur wurde von Dr. Janina Niggenaber gelöst.

Da dies jedoch auch bei Kontrollverbindungen beobachtet wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein nach der Behandlung mit Kupfer partiell denaturiert wurde oder die Reaktion außerhalb der Bindungstasche stattfand. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz verworfen. Die *Hits* (**6 a-f**) wurden stattdessen in einer Re-Synthese nachsynthetisiert und anschließend charakterisiert. In dosis-abhängigen Studien konnten im CTG-Assay Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich gemessen werden, wodurch wichtige strukturelle Eigenschaften der Moleküle in einer SAR identifiziert werden konnten. In MS-basierten Studien konnte ebenfalls die kovalente Bindung am gewünschten Cys12 beobachtet werden.

Zukünftig sollten die identifizierten Treffer weiter modifiziert werden, um die Bindungsaffinität sowie die zelluläre Potenz der Inhibitoren zu verbessern. Ko-Kristallisationsstudien könnten herangezogen werden, um das Design neuer Inhibitoren rational zu gestalten. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit noch keine solche Struktur erhalten werden konnte, sollte dies in zukünftigen Studien behandelt werden. Es konnte jedoch eine Apo-Struktur generiert werden, die mit bereits publizierten Strukturen übereinstimmt.

Entwicklung von neuartigen Nukleotid-basierten Inhibitoren für die onkogene KRAS^{G13C}-Variante

Neben den onkogenen Mutationen an Codon 12 treten auch Mutationen an den Hotspots 13 und 61 auf, die eine Rolle in der Tumorentstehung spielen, aber bisher nur unzureichend erforscht und adressiert wurden.⁹⁷ Ein erworbenes Cystein kann nicht nur an Codon 12, sondern auch an der benachbarten Position 13 gefunden werden. Mutationen an Codon 13 können in 14 % aller Tumore nachgewiesen werden, wobei es sich in 6 % aller Fälle um eine Glycin-zu-Cystein-Substitution handelt.^{116, 117} Über die Physiologischen und pathologischen Funktionen dieser Mutante ist bislang wenig bekannt. Für die G13D-Varianten konnte gezeigt werden, dass sie eine erhöhte intrinsische Nukleotid-Austauschrate aufweisen, wodurch das Protein überwiegend im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vorliegt.¹¹⁸ Das erworbene Cystein an Position 13 kann ähnlich wie Cys12 als kovalenter Ankerpunkt genutzt werden, um mutanten-spezifische Moleküle zu entwickeln. Diese könnten sowohl als molekulare Werkzeuge zur Aufklärung der Biologie dieser Variante dienen als auch als potenzielle Inhibitoren fungieren. Da die Nukleotidbindungs-Tasche sowie die Bindung von GDP und GTP entscheidend für die Signalweiterleitung der GTPase sind, stellen Inhibitoren, die die GTPase in ihrem inaktiven Zustand stabilisieren, eine potenzielle Methode zur Modulation der Aktivität dar. Die gezielte Stabilisierung des inaktiven Zustands der GTPase bietet somit einen vielversprechenden Ansatz zur Regulierung der Signaltransduktionswege, die durch diese Enzyme gesteuert werden. Lange Zeit wurde die orthosterische Inhibition von kleinen GTPasen - insbesondere von KRAS - als nicht möglich erachtet. Dies liegt an der hohen Affinität der natürlichen Substrate GDP und GTP, die im picomolaren-Bereich liegt, gepaart mit der hohen intrazellulären Konzentration von GDP und GTP.^{52, 53} Im Jahr 2014 konnte aber in der Arbeitsgruppe um Nathanael Gray gezeigt werden, dass modifizierte Nukleotide, welche eine elektrophile Gruppe tragen, durchaus als GDP-kompetitive Inhibitoren fungieren. Der aus diesen Arbeiten resultierende Modulator SML-8-73-1 trägt am β -Phosphat eine verlängernde Linkergruppe, an die der *warhead* angebracht wurde. Dies ermöglicht die kovalente Modifikation des erworbenen Cys12.^{54, 119}

Allerdings erwies sich die Position der Modifikation am β -Phosphat des GDP-Grundgerüsts mit Chloracetamid als ungünstig. Dies führte zu einem Verlust wesentlicher Wechselwirkungen mit dem Protein und dem Magnesiumion, was eine verminderte reversible Affinität zur Folge hatte ($K_d(\text{SML-8-73-1}) = 0,14 \mu\text{M}$, $K_d(\text{GDP}) = 2,5 \text{ pM}$). Folglich konnte das von SML-8-73-1 abgeleitete Prodrug-Molekül in zellulären Experimenten nicht ausreichend mit den Guanin-Nukleotiden konkurrieren.^{54, 120} Weiter wurde für die GTPase Ypt7Q35C ein Molekül (aGDP) von WIEGAND et al. entwickelt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass der *warhead* an dem N2 der Base installiert wurde und somit nicht an den Phosphaten modifiziert wurde.¹²¹ Anhand dieser Beispiele konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass neben der kovalent-allosterischen Modulierung von KRAS auch die orthosterische Inhibierung mit Hilfe von kovalent-reagierenden Molekülen möglich ist.

Im Rahmen der Dissertation von Dr. Lisa Goebel wurden erstmals kleine Moleküle entwickelt und charakterisiert, die kovalent an die noch weitgehend unerforschte KRAS^{G13C}-Mutante binden. Hierfür wurden Moleküle konzipiert, die ein lineares Linkermotiv (eda: Ethylendiamin, pda: Propylendiamin und bda: Butylendiamin) sowie den Acrylamid-*warhead* tragen. Dieser *warhead* zeigt eine geringe unspezifische Reaktivität gegenüber Thiolgruppen, was ihn als besonders biokompatibel auszeichnet. Um jedoch eine gezielte Reaktion mit dem gewünschten Cysteinrest zu ermöglichen, muss der *warhead* im initialen, reversiblen Bindungsschritt korrekt ausgerichtet sein.^{26, 122} Im Gegensatz zu dem GDP-Analogon SML-8-73-1 wurde in diesem Projekt nicht das β -Phosphat, sondern die 2'- und 3'-Positionen der Ribose als Derivatisierungsstelle gewählt. Durch diese Modifikation konnte das Diphosphat-Motiv beibehalten werden, was weiterhin eine hoch affine Bindung im Protein ermöglicht. Vor der Synthese wurden mittels Co-Kristallstrukturen und Struktur-basiertem Liganden-Design (engl. *structure-based drug design*, SBDD) geeignete Linkerlängen untersucht, um eine optimale Ausrichtung der Thiol-reaktiven Gruppe zu gewährleisten. Die Synthese erfolgte nach einer modifizierten Methode von CREMO et al. (1990) und EBERTH et al. (2005).^{123, 124} Die hergestellten Verbindungen standen für biochemische, zelluläre und kristallographische Untersuchungen zur Verfügung.

Die bisherigen Experimente zeigten, dass die entwickelten Nukleotid-Analoga (Acryl-eda-GDP, Acryl-pda-GDP und Acryl-bda-GDP) lediglich eine moderate Modifikationsrate zu KRAS^{G13C} bei physiologischem pH-Wert aufweisen.⁹⁷

Eine mögliche Strategie zur Verbesserung könnte darin bestehen, den bisher verwendeten linearen Linker durch ein rigideres System zu ersetzen und somit die Flexibilität des Linkers herabzusetzen. Dies würde eine verbesserte prä-Organisation der reaktiven Gruppe ermöglichen und könnte somit zu einer gesteigerten Reaktivität bei physiologischem pH beitragen. Hierzu soll im Folgenden eine Designstrategie sowie eine geeignete und effiziente Syntheseroute etabliert und diskutiert werden um ebendiese Moleküle zu realisieren.

Design und Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek

Bei der näheren Betrachtung der Kristallstruktur von eda-GDP (**15a**) im Komplex mit KRAS^{G13C} zeigte sich, dass der Linker eine gebogene Orientierung einnimmt. Diese Struktur und die damit vermutlich hohe Flexibilität könnten erheblich dazu beitragen, dass bei physiologischem pH-Wert nur eine verminderte Reaktivität gegenüber dem Cystein beobachtet wird. Um die Reaktivität zu optimieren, sollte daher die Orientierung des Linkers und damit der elektrophilen Gruppe relativ zum Cystein vor der kovalenten Modifikation verbessert werden. Hierzu sollten unterschiedlich substituierte Ringsysteme verwendet werden, um die Rigidität des Linkers zu erhöhen. Basierend auf der Kristallstruktur von eda-GDP wurden mögliche Ringsysteme in kovalenten *Docking*-Studien mit LIGANDSCOUT¹²⁵ untersucht. Hierzu wurden Ringe unterschiedlicher Größe (Fünf-, Sechs- und Sieben-Ringe) verwendet, die an unterschiedlichen Positionen modifiziert wurden. Beispielhafte Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 20 dargestellt, wobei eda-GDP (**15a**) als Vergleichsstruktur diente. Ein wesentliches Augenmerk lag auf dem Erhalt der starken Wechselwirkungen des GDP-Moleküls, welche durch die kovalente Bindung innerhalb der Bindungstasche nicht beeinflusst werden sollten. In allen drei getesteten Ringstrukturen (**15f,g; 15d; 15b,c**) konnte nach Evaluierung der *Docking*-Ergebnisse eine Pose visualisiert werden, die eine hohe Deckungsgleichheit mit der parentalen Struktur (eda-GDP (**15a**), PDB 7OK3) aufweist. Dabei bleibt das GDP-Grundgerüst unverändert. Dies deutet darauf hin, dass die getesteten Ringsysteme eine geeignete Größe besitzen, da trotz der vorgesehenen kovalenten Bindung keine Beeinträchtigung der Bindung des Grundgerüsts festgestellt wurde. Anhand der Ergebnisse der *Docking*-Studien wurden die am besten geeigneten Ringsysteme für die anschließenden Synthesen ausgewählt. Außerdem sollten auch negative Beispiele synthetisiert werden, um die Ergebnisse der *Docking*-Studien zu validieren.

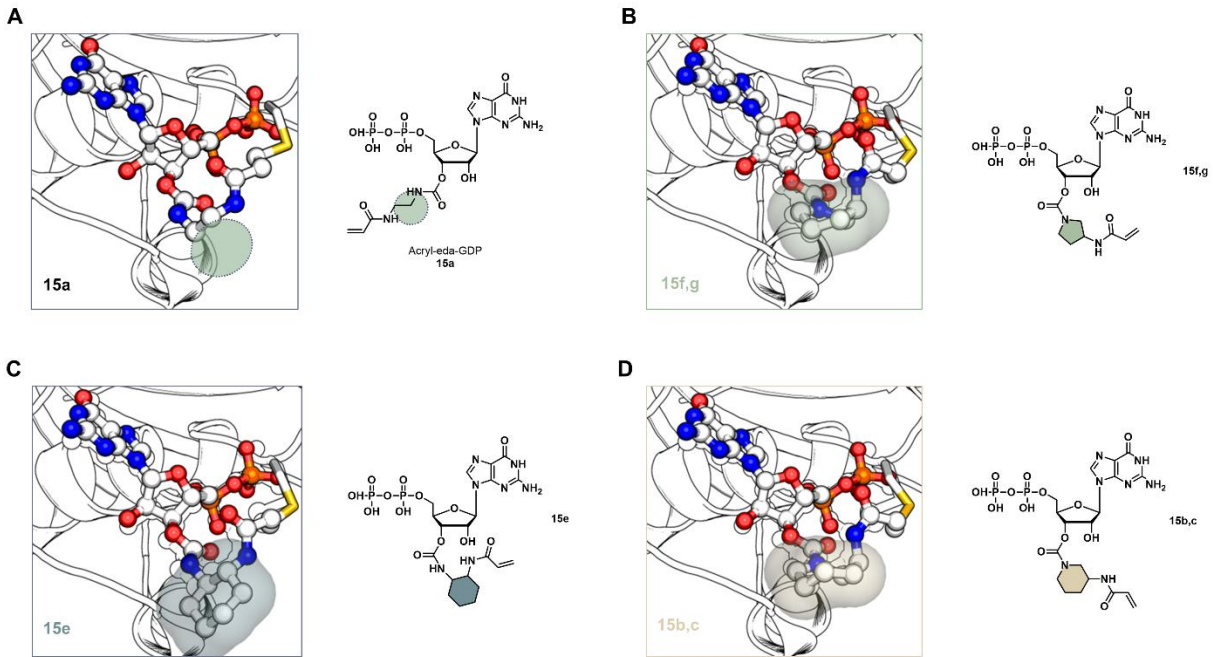


Abbildung 20. **A:** Designvorschlag für zyklische Linker basierend auf der Verbindung eda-GDP (**15a**) (PDB 7OK3). **B - D:** Docking-Studien durchgeführt in LIGANDSCOUT¹²⁵ von möglichen Zielstrukturen (**15f,g**; **15d**; **15b,c**) mit unterschiedlichen zyklischen Linkern basierend auf der Struktur von PDB 7OK3.

Um den Zugang zu einer Substanzbibliothek zu verbessern, wurde eine innovative Synthesestrategie angewendet, die einerseits die Darstellung einer Vielzahl von strukturell diversen und zyklischen Aminen ermöglicht und andererseits im Vergleich zur herkömmlichen Syntheseroute wesentlich zeitsparender ist (Abbildung 21).

Ursprünglich wurde zur Darstellung von GDP-basierten Inhibitoren die Syntheseroute, welche in GOEBEL *et al.* bereits publiziert wurde und sich an CREMO *et al.* und EBERTH *et al.* orientiert, genutzt.^{97, 123, 124} Im ersten Schritt wurde das kommerziell erhältliche Natriumsalz von GDP verwendet und mittels Kationenaustausch-Chromatographie in das Tetrabutylammonium-(TBA-)Salz überführt, welches in Dimethylformamid (DMF) löslich ist und in der weiteren Synthesesequenz als Lösungsmittel dient. Zunächst wurde das Natriumsalz des GDP durch den Kationenaustauscher gegen Protonen ausgetauscht.

Da GDP jedoch unter sauren Bedingungen instabil ist, wurde im anschließenden Schritt Tributylamin zugegeben, um die Stabilität des Nukleotids zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Modifikation der 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose mit Carbonyldiimidazol (CDI), wobei durch nukleophile Substitution ein zyklisches Carbamat entstand. Eine Nebenreaktion führte zur Modifikation der endständigen Phosphatgruppe mit Imidazol zu dem entsprechenden Phosphoamidat. Daraufhin wurden primäre Amine zugegeben, wodurch die 2'- und 3'-Position der Ribose unter Abspaltung von CO_2 sowie die endständige Phosphatgruppe unter Abspaltung von Imidazol modifiziert wurden. Überschüssiges Amin wurde durch wiederholte Zentrifugation und anschließendes Waschen mit DMF entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Abspaltung der Aminogruppe des Phosphats im sauren Milieu von HCl. Die Reinigung der Verbindungen mit freien, negativ geladenen Phosphatgruppen wurde mithilfe eines Anionenaustauschers durchgeführt. Das Säulenmaterial bestand aus einer Agarose-Matrix mit quartären Aminen als Liganden. Durch einen linearen Gradienten einer Triethylamin-Lösung (50 mM bis 1 M) konnten die Nukleotide eluiert und anschließend mittels HPLC analysiert werden. Als Referenz diente ein Gemisch (G-Mix) bestehend aus Guanosin, Guanosinmonophosphat (GMP), GDP, GppNHp, seinem Abbauprodukt GppNH₂ und GTP. Im letzten Schritt wurde die Acrylgruppe mithilfe eines Aktivesters eingeführt und wie zuvor beschrieben über den Anionenaustauscher gereinigt sowie mittels HPLC analysiert.

Die neue Synthesestrategie folgt hingegen einem konvergenten Ansatz, bei dem die Amine in einem zweistufigen Prozess mit dem *warhead* modifiziert werden (Abbildung 21). Hierfür wird zuerst das Boc-geschützte Amin mit Acryloylchlorid versetzt und anschließend in einer TFA-sauren Entschützung weiter umgesetzt, wobei das freie Amin entsteht, welches zur Generierung der Carbamate genutzt werden kann. Diese Zwei-Schritt-Synthese konnten in moderaten bis hin zu guten Ausbeuten realisiert werden. Gleichzeitig wurde, ähnlich wie bei der alten Methode, das jeweilige Nukleotid durch die Verwendung des Reagenz CDI geschützt. Anschließend wurden das modifizierte Amin und das CDI-geschützte Nukleotid in einer nukleophilen Substitution kombiniert.

Dabei entsteht nicht nur das gewünschte 2',3'-modifizierte Nukleotid, sondern hauptsächlich eine zusätzlich am Phosphat veränderte Spezies. Das Amin am Phosphat kann durch eine saure Hydrolyse-Reaktion entfernt werden, und das gewünschte 2',3'-substituierte GDP-Analogon wird erhalten.

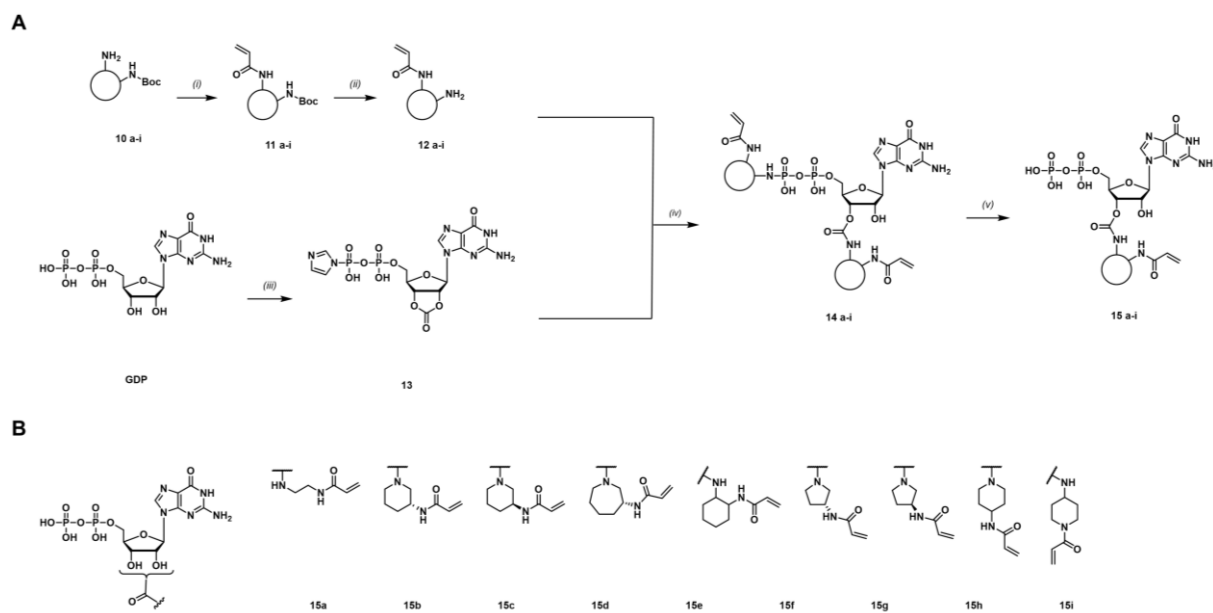


Abbildung 21. A: Konvergente Syntheseroute der neuartigen Nukleotid-basierten Verbindungen. Konditionen: (i) Acryloylchloride, DIPEA, THF, rt, 12 h; (ii) DCM/TFA (3:1), rt, (48,5 - 91,3 %); (iii) CDI, DMF, 4 °C, 12 h; (iv) DIPEA, DMF, rt, 12 h; (v) aq. HCl (pH 1.5) 1-7 d. **B:** Übersicht der MICHAEL-AKZEPTOR-tragenden GDP-basierten Verbindungen (**15a-i**).

Im Vergleich zur alten Syntheseroute erfordert die neue Synthese lediglich eine Aufreinigung anstelle von zwei. Hierfür wird eine Anionenaustausch-Chromatographie an einem automatisierten Äkta-System durchgeführt (Abbildung 22). Die konvergente Syntheseroute minimiert den Arbeitsaufwand durch die einfache anstelle der doppelt durchgeführten Aufreinigung und ermöglicht den Einsatz chemisch diverserer Diamine.

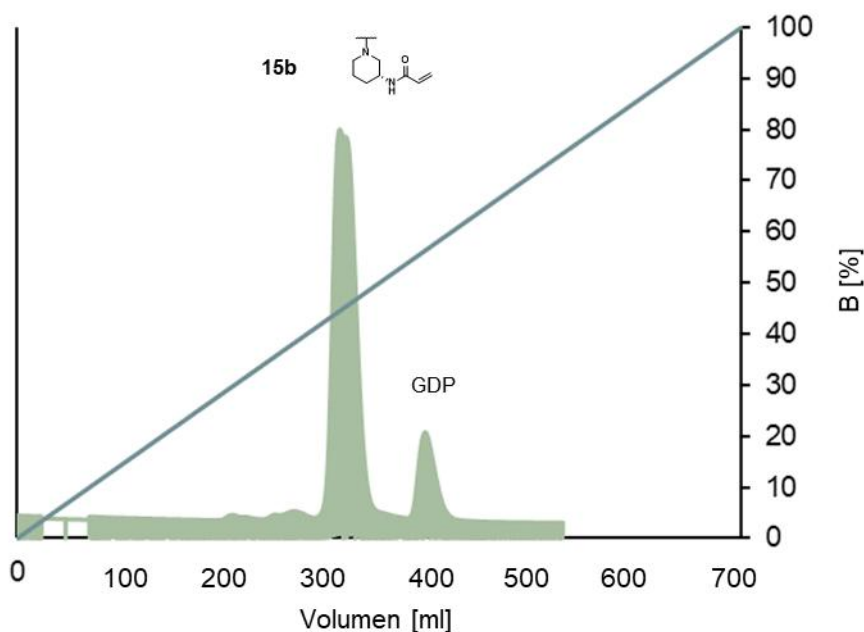


Abbildung 22. Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie. Als stationäre Phase wurde eine Matrix aus Agarose und quartäre Ammonium-Ionen gewählt und zur Elution der Nukleotide eine 50 mM - 1 M TEA-Lösung verwendet.

Für die Untersuchung der SAR wurden unterschiedlich große, aliphatische Ringsysteme (5-, 6-, 7-Ring) mit Substitutionen an verschiedenen Positionen (1,2; 1,3; 1,4) getestet. Die Substitutionen unterscheiden sich auch durch ihre endo- oder exozyklische Platzierung, wodurch die Positionierung des *warheads* variiert werden soll. Diese sollen im Folgenden charakterisiert werden.

MS-basierte Charakterisierung der neuartigen GDP-basierten Verbindungen

In initialen Massenspektrometrie-basierten Studien wurden die neuartigen Acrylamid-tragenden Verbindungen (**15b-i**) im Vergleich zu dem parentalen Molekül eda-GDP (**15a**) untersucht. Dabei wurde die kovalente Reaktion der Moleküle mit dem Protein über eine MICHAEL-artige Addition hin untersucht. Hierzu wurde zunächst das KRAS^{G13C}₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) Konstrukt⁸ verwendet. Erwartungsgemäß sollte bei den MS-basierten Experimenten eine Verschiebung des Massen-Peaks beobachtet werden, die der Masse der kovalent reagierenden Verbindung entspricht.

⁸ Die in diesem Abschnitt verwendeten Proteine wurden von Andreas Arndt exprimiert und gereinigt.

Dabei fiel auf, dass, ähnlich wie bei eda-GDP, die Reaktivität der Verbindungen bei einem nahezu physiologischen pH-Wert von 7,5 sehr gering war (Abbildung 23). Infolge dessen wurden Spektren aufgenommen, wobei das Protein mit den Verbindungen in einem zehnfachen Überschuss für 24 h bei ansteigenden pH-Werten (7,5 - 9,5) inkubiert wurden.

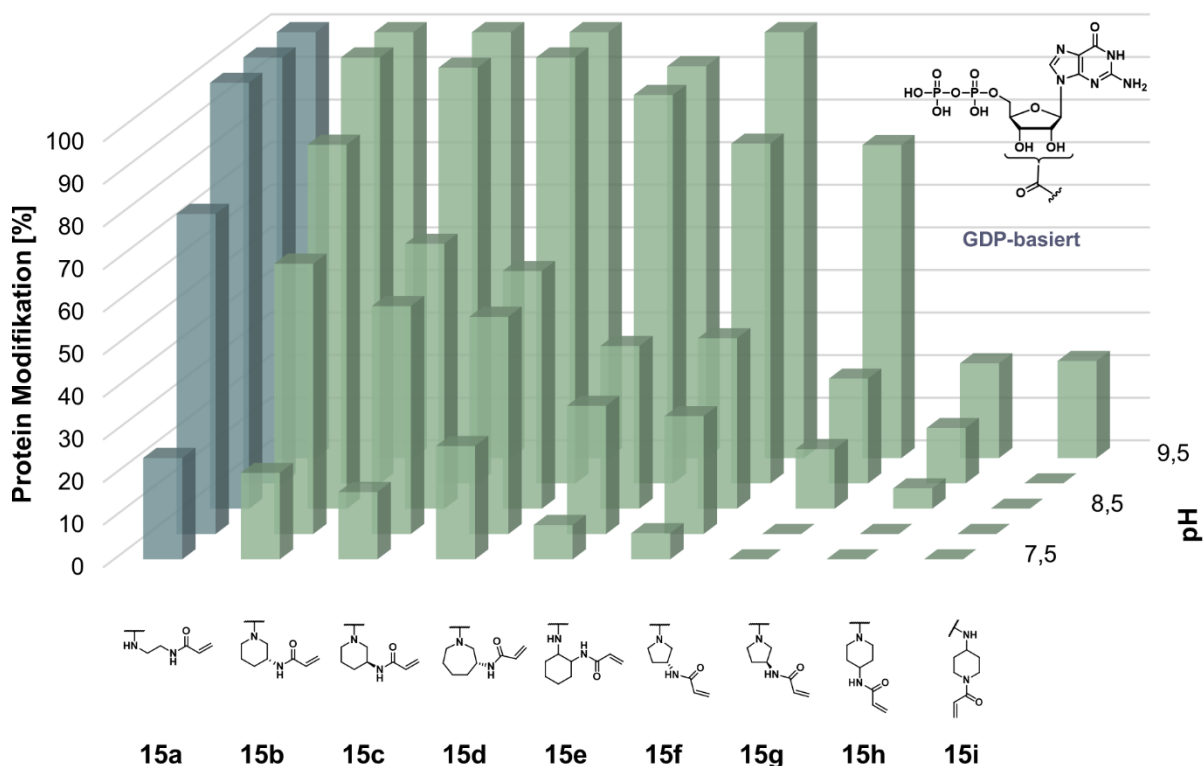


Abbildung 23. MS-basierte Studien in Abhängigkeit des pH-Wertes der erhaltenen Verbindungen (**15a-i**) mit KRAS^{G13C}(Cys-light). Die prozentuale Modifikation wurde gegen den pH-Wert aufgetragen.

Nach Analyse der Daten wurde ersichtlich, dass im Vergleich zu den neuen Verbindungen eda-GDP (**15a**) das beste Reaktivitätsprofil aufweist. In ähnlichem Maße modifizieren auch die Verbindungen **15b** bis **15d** das gewünschte Cystein. Die Moleküle reagieren bei höheren pH-Werten vollständiger mit KRAS^{G13C}, was mit der steigenden Nukleophilie des Cysteins bei höherem pH-Wert zusammenhängt. Auffällig ist, dass 1,3-modifizierte 6-Ringe das beste Profil aufweisen, gefolgt von 5- und 7-Ringen. Der 1,2-modifizierte 6-Ring, welcher in vorausgegangenen *Docking*-Studien ein sehr gutes Ergebnis lieferte, zeigt lediglich eine moderate Reaktivität. Dagegen weisen 1,4-substituierte 6-Ringe ein vergleichsweise schlechtes Verhalten auf, was auf eine ungünstige Ausrichtung des *warheads* zurückzuführen ist.

Dieses Verknüpfungsmuster führt zu einer Orientierung des *warheads* in eine lösungsmittlexponierte Region. Zudem ist auffällig, dass *warheads*, die an exo-ständigen Aminen angebracht wurden, bevorzugt erscheinen.

Dies mag an der erhöhten Flexibilität des Elektrophils liegen. Außerdem scheint eine *S*-Konfiguration bevorzugt zu sein.

Anschließend wurde das zeitaufgelöste Bindungsverhalten der neu synthetisierten Verbindungen (**15b-d**) untersucht. Hierzu wurden die Verbindungen bei einem pH-Wert von 9,5 inkubiert, und Proben wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen, um die prozentuale kovalente Modifikation zu bestimmen. Dieses Experiment wurde ebenfalls vergleichend mit der parentalen Verbindung eda-GDP (**15a**) durchgeführt (Abbildung 24).

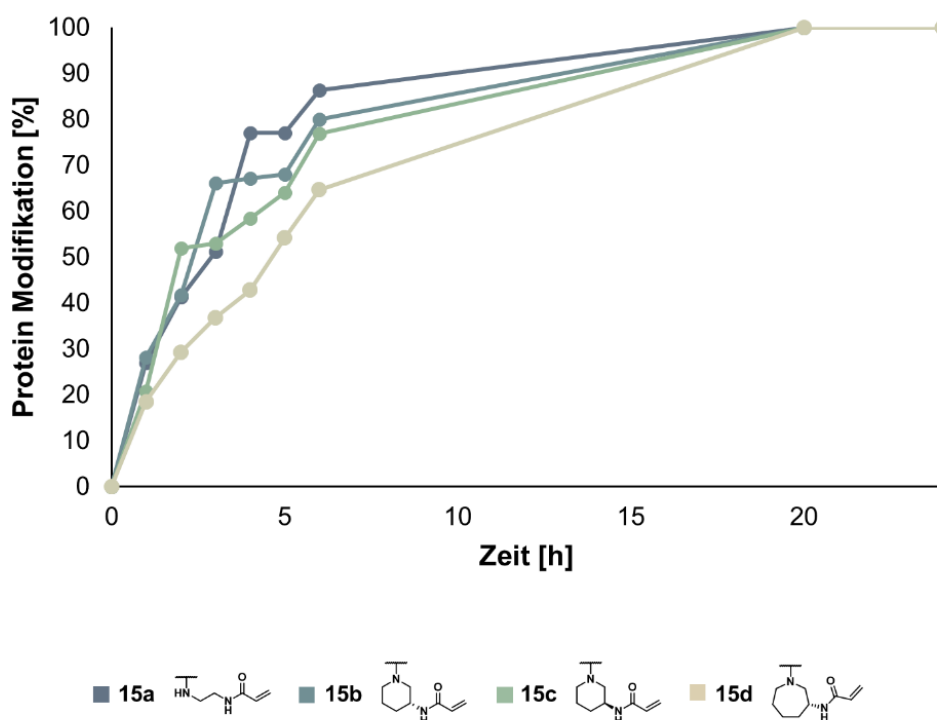


Abbildung 24. Zeitliche MS-basierte Analyse der drei Verbindungen (**15b-d**) im Vergleich zu der Parental-Verbindung eda-GDP (**15a**) mit KRAS^{G13} (Cys-light). Die prozentuale, kovalente Modifikation wurde gegen die Zeit [h] aufgetragen.

Es zeigte sich, dass eda-GDP (**15a**) und **15b** eine vergleichbare Modifikationsrate aufweisen. Zudem wurde ein schlechteres Modifikationsverhalten bei den Verbindungen **15c** und **15d** beobachtet, was auf eine ungünstigere prä-Orientierung der elektrophilen Gruppe hinweist.

Dennoch lässt sich festhalten, dass die zeitliche kovalente Modifikationsrate der drei neuartigen Verbindungen im Vergleich zu **15a** etwas schlechter ist, aber sich in einem ähnlichen Rahmen bewegt.

Das Bindungsverhalten der getesteten Verbindungen gegenüber KRAS^{wt}(1-169) und KRAS^{G12C}(1-169) war ebenfalls von besonderem Interesse, um die Selektivität der neuen kovalenten Moleküle zu untersuchen. Aus struktureller Sicht ist es den Verbindungen kaum möglich an das Cys12 von KRAS^{G12C} zu binden, da der Linker zu kurz und zu unflexibel ist. Für diese Untersuchung wurden **15a** und die Verbindungen **15b-d** in einem pH-Bereich von 7,5 bis 9,5 untersucht. Bei dem KRAS^{G12C} Konstrukt handelt sich genau wie bei KRAS^{G13C} auch um die verkürzte und die *Cys-light* Variante, wohin gegen der Wildtyp auch drei Oberflächen-exponierte Cysteine aufweist.

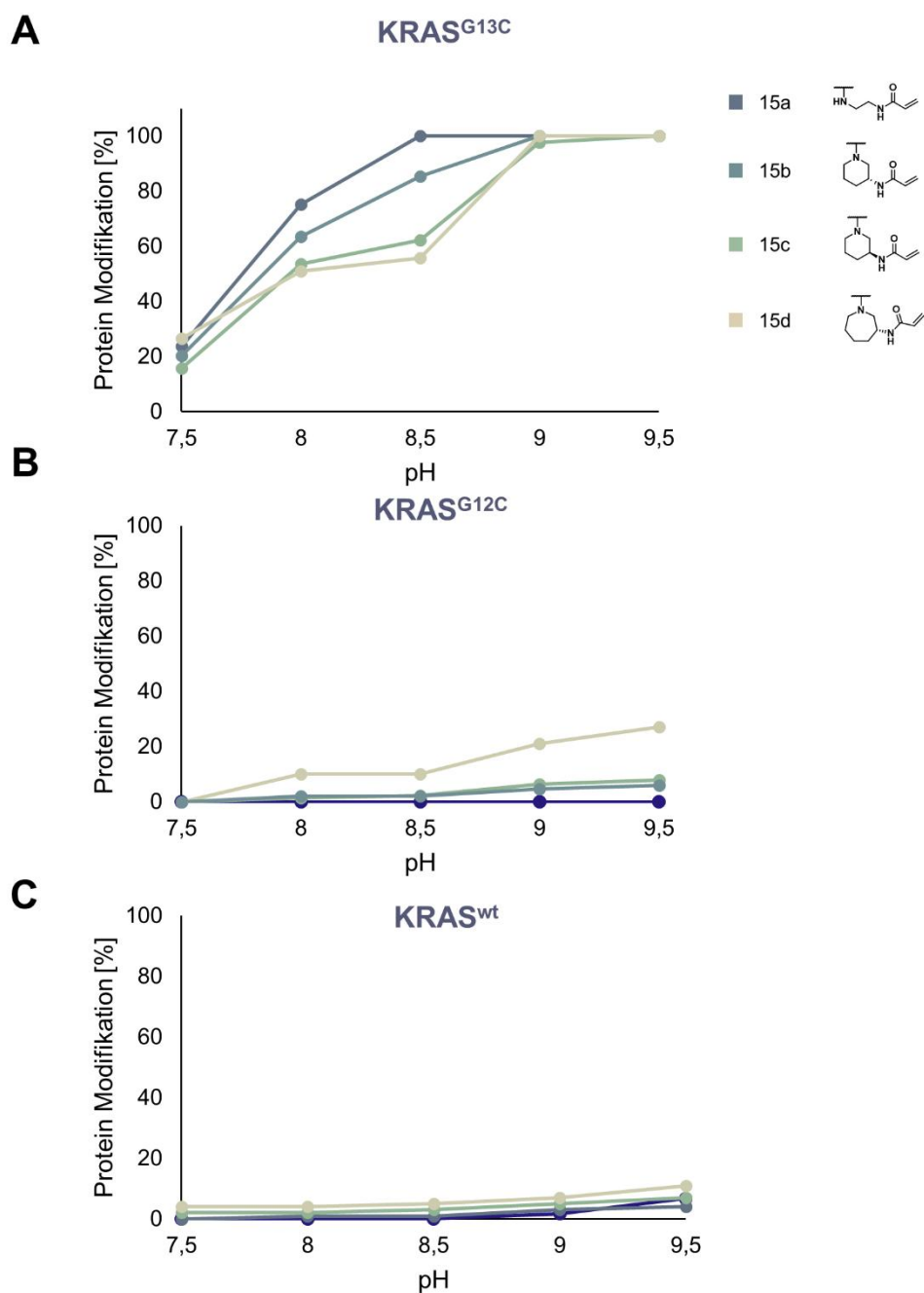


Abbildung 25. Vergleichende Analyse der drei Verbindungen **15b-d** mit der Kontroll-Verbindung eda-GDP (**15a**) mit den Proteinen KRAS^{G13C}(*Cys-light*) (**A**), KRAS^{G12C}(*Cys-light*) (**B**) und KRAS^{wt}₁₋₁₆₉ (**C**). Die kovalente, prozentuale Proteinmodifikation wurde gegen den pH-Wert aufgetragen.

Die Ergebnisse zeigten ein exzellentes Selektivitätsprofil der getesteten Verbindungen sowohl gegenüber der G12C-Mutante als auch dem Wildtyp. Für alle getesteten Moleküle wurde keine bis nur eine sehr geringe Modifikationsrate beobachtet. Lediglich bei einem hohen pH-Wert von 9,5 konnte eine geringe kovalente Modifikation festgestellt werden.

Es wird jedoch angenommen, dass diese kovalente Bindung an das Cystein von außen stattfindet, da das Cys13 in der Nähe einer lösungsmittlexponierten Region lokalisiert ist. (Abbildung 25).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die drei besten Verbindungen **15b-d** ein ähnliches Bindungs- und Reaktivitätsverhalten wie die parentale Verbindung **15a** aufweisen. Alle getesteten Moleküle zeigten eine sehr gute Selektivität gegenüber KRAS^{G13C} im Vergleich zu G12C und dem Wildtyp. Dennoch konnte keine Verbesserung der Reaktivität gegenüber dem Cys13 erreicht werden, was einen weiteren Optimierungszyklus erforderlich macht, um geeignete Linker zu identifizieren. Verbessernd hinsichtlich der Reaktivität der kovalenten Verbindungen könnte der Einsatz von dGDP-Derivaten sein. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Verbindungen synthetisiert, welche von dem GDP-Grundgerüst ausgehen und somit 2'- und 3'-Isomere bilden. Diese Isomerisierung passiert spontan. Aus Kristallisations- und *Docking*-Studien ging hervor, dass lediglich das 3'-Isomer an das Cystein binden kann, da hier der geeignete Abstand eingenommen wird. Mit der Verwendung des dGDP-Grundgerüsts kann diese notwendige Isomerisierung umgangen werden, da nur das 3'-Derivat vorliegen würde und die Bindung somit schneller und effizienter ablaufen könnte. Eine zusätzliche Herangehensweise zur Optimierung stellt die Modifikation des *warheads* dar. Hier könnten stärkere Elektrophile eingesetzt werden. Interessant ist hierbei auch der Di-Methylamino-*warhead*, bekannt aus dem Molekül Neratinib.⁶² Es wurde beschrieben, dass das endständige tertiäre Amin zur Deprotonierung und Stabilisierung der Thiolgruppe des Cysteins beiträgt. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Interaktion desamins mit den negativ geladenen Phosphatgruppen denkbar, was vorteilhaft sein könnte.

GEF-katalysierter Nukleotid-Austausch

Die massenspektrometrischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die erhaltenen Verbindungen zwar kovalent an das Zielprotein binden, dies jedoch allein keinen Beweis für inhibitorische Effekte darstellt.

Im nächsten Schritt sollte daher geprüft werden, ob die kovalente Bindung das RAS-Protein im jeweiligen Nukleotidzustand stabilisiert oder ob ein Nukleotidaustausch trotz der kovalenten Modifikation weiterhin möglich ist. Der Austausch erfolgt über den GEF SOS. Für den Assay wurde ein KRAS-Protein (5 μM) mit einem Fluorophor-modifizierten GDP (3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-2'-deoxyguanosin-5'-diphosphat (mantGDP), 10 μM) und SOS (0,25 μM und 0,5 μM) versetzt. Ein Anstieg der Fluoreszenz im Verlauf des Experiments deutet darauf hin, dass ein Nukleotid-Austausch stattgefunden hat.

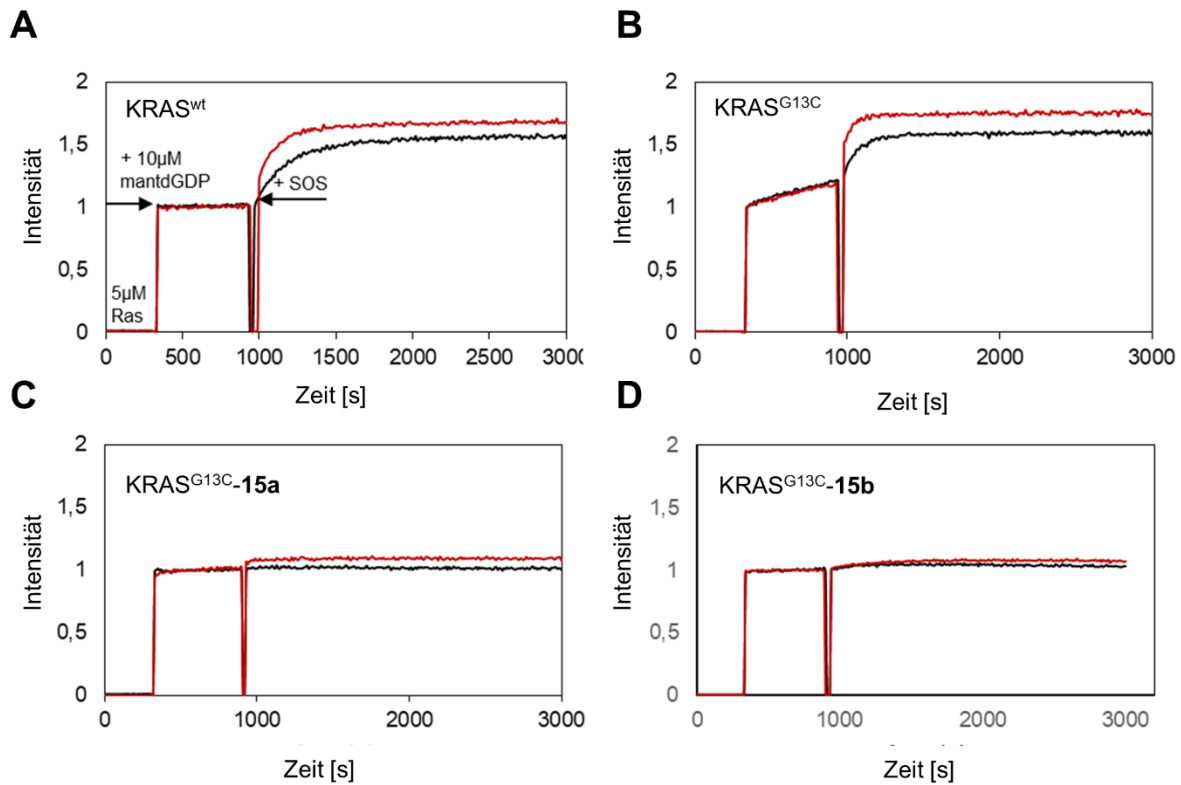


Abbildung 26. GEF-katalysierter Nukleotid-Austausch mit den Proteinen KRAS^{wt} (A), KRAS^{G13C} (B) und der KRAS^{G13C}-Variante, welche vorblockiert wurde mit der Verbindung **15a** (C) und **15b** (D).⁹

Frühere Arbeiten von GOEBEL *et al.* haben bereits gezeigt, dass für den Wildtyp KRAS eine Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe des GEFs SOS beobachtet wird.

Im Vergleich dazu zeigt die KRAS^{G13C}-Variante bereits einen Anstieg der Fluoreszenz ohne Zugabe des GEFs (Abbildung 26).⁹⁷ Dies lässt darauf schließen, dass die Mutante eine erhöhte intrinsische Nukleotid-Austauschrate aufweist.

Ähnliches wurde bereits für die KRAS^{G13D}-Mutante beschrieben.¹²⁶ Vermutlich trägt diese Eigenschaft der G13-Mutanten zum onkogenen Effekt bei, da der erhöhte Nukleotid-Austausch dazu führt, dass das in der Zelle präsentere GTP vorwiegend gebunden wird. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Aktivierung von KRAS und somit zu einer gesteigerten Signalweiterleitung (Abbildung 26).

⁹ Die Spektren für KRAS^{wt}, KRAS^{G13C} und KRAS^{G13C}-**15a** wurden von Dr. Lisa Goebel aufgenommen.

Wenn KRAS^{G13C} jedoch mit dem kovalent-bindenden **15a** blockiert ist, zeigt sich, dass die Fluoreszenz nicht steigt, was bedeutet, dass kein Nukleotid-Austausch stattfinden kann. Das gleiche Ergebnis wurde für den im Rahmen dieser Arbeit generierten Inhibitor **15b** beobachtet. Somit scheint die Modifikation des Linkers toleriert zu werden, und die Verbindung verhindert weiterhin den Nukleotid-Austausch (Abbildung 26).

GST-Pulldown Assay¹⁰

Durch einen SOS-Austausch-Assay wurde bereits gezeigt, dass die kovalente Modifikation von **15a** und **15b** von KRAS^{G13C} den Austausch zu GDP verhindert. Eine weitere Fragestellung besteht daher darin, ob aufgrund dieser Modifikation auch die Effektorbindung an das Effektorprotein cRaf verhindert werden kann. Hierzu wurde ein Assay entwickelt, bei dem zuvor mit **15a** und **15b** modifiziertes KRAS^{G13C}, in An- sowie Abwesenheit von SOS, mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Derivat GppNHp und der RAS-Bindedomäne von cRaf (RBD) inkubiert wurde. Als Kontrollexperiment wurde nicht-modifiziertes KRAS^{G13C} unter den gleichen Bedingungen getestet. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die verschiedenen Ansätze auf Glutathion-Agarose-Beads aufgebracht. Die RBD ist mit einem Glutathion S-Transferase (GST)-Tag versehen, welches eine Bindung an das Glutathion an den Beads ermöglicht. Durch einen Pulldown der c-Raf-RBD kann KRAS in seiner aktiven Konformation selektiv angereichert und anschließend per SDS-PAGE detektiert werden.

Ist die Aktivierung des KRAS-Proteins jedoch durch die kovalente Bindung an den Inhibitor blockiert, sollte keine Anreicherung der aktiven Form auftreten, unabhängig von der Anwesenheit von SOS. In diesem Fall bleibt KRAS inaktiv und ist im SDS-PAGE nicht in der aktiven Konformation nachweisbar.

In Abbildung 27 ist ersichtlich, dass im Fall des un-modifizierten KRAS^{G13C} im GDP-gebundenen Zustand keine zusätzliche Bande zu sehen ist, was zeigt, dass KRAS sich weiterhin im inaktiven Zustand befindet und nicht mit der RBD interagiert.

¹⁰ Die Raf-RBD wurde von Andreas Arndt exprimiert und gereinigt.

Da das GDP-Grundgerüst negativ geladene Phosphatgruppen enthält, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Moleküle die Zellmembran passieren können. Dies wurde bereits in der Dissertation von Dr. Lisa Goebel untersucht und bestätigt. Eine Möglichkeit, welche bereits in der Publikation GOEBEL *et al.*⁹⁷ genutzt wurde, ist die Elektroporation der modifizierten KRAS-Proteine in HeLa-Zellen, welche anschließend über Western Blot Analysen auf den Effekt von *downstream*-Partnern hin untersucht wurden.

Strukturelle Analyse des neuartigen Liganden im Komplex mit KRAS^{G13C}

Um die Prä-Orientierung des Linkers und somit des *warheads* eingehender zu verstehen und eine fundierte Grundlage für zukünftige Optimierungsversuche zu schaffen, wurde angestrebt, mit den neu erhaltenen Verbindungen Ko-Kristallisationsexperimente durchzuführen.

Probenvorbereitung für die Kristallisationsexperimente

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass es hilfreich ist, dass zu kristallisierende Protein vollständig kovalent mit der gewünschten Verbindung zu modifizieren und anschließend über eine Gelfiltrationschromatographie aufzureinigen. Dieser Ansatz ermöglicht es, potenziell entstandene Aggregate des Proteins, überschüssige Moleküle sowie den *Labeling*-Puffer, welcher einen erhöhten pH-Wert aufweist, zu entfernen und gegen den Kristallisationspuffer auszutauschen. Dazu wurde das Protein in einer Konzentration von 2 mg/ml mit einem Überschuss an Inhibitor für 24 Stunden bei Raumtemperatur modifiziert und der Prozess mittels MS-Analyse verfolgt.

Anschließend wurde das Protein über eine Gelfiltration gereinigt und auf eine Endkonzentration von 70 mg/ml aufkonzentriert (Abbildung 28).

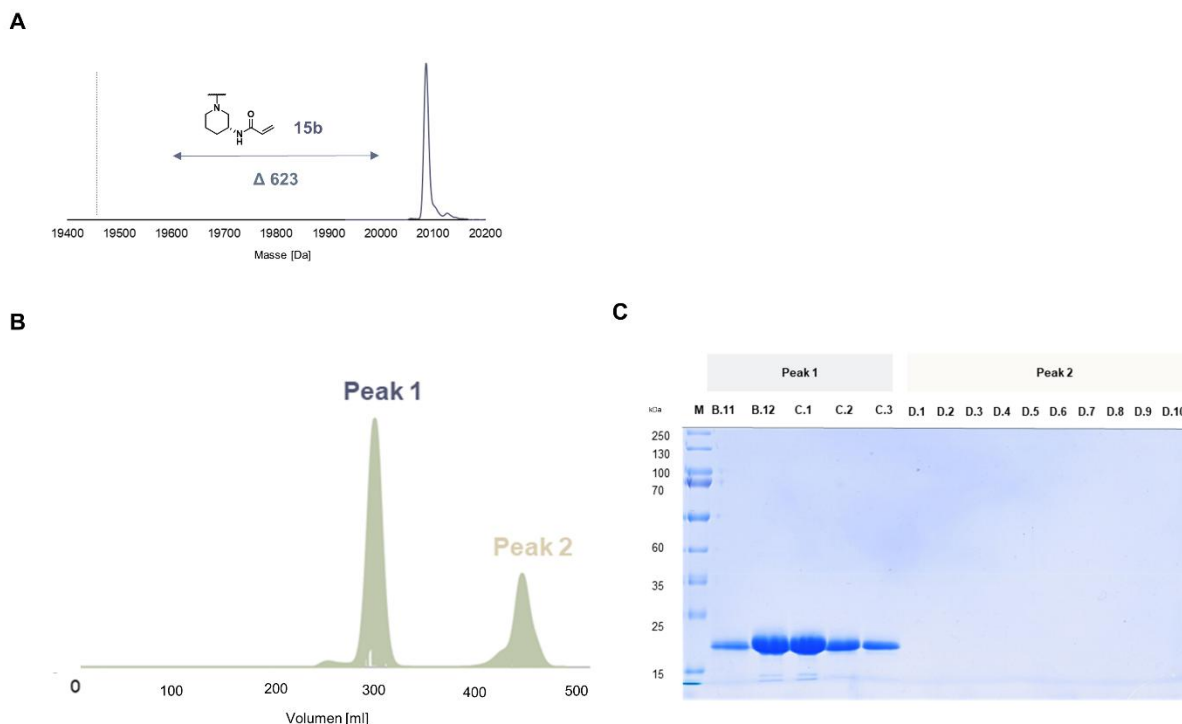


Abbildung 28. A: Vollständige kovalente Modifikation von KRAS^{G13C} (*Cys-light*) mit **15b**. **B:** Chromatogramm der SEC nach der kovalenten Modifikation des Proteins mit dem kovalenten Inhibitor. **C:** Analyse der Fraktionen aus der SEC mittels SDS-PAGE.

Proteinkristallisation

In einem ersten Versuch wurde versucht, die in der Literatur beschriebenen Bedingungen von 7OK3 oder 7OK4 (eda- bzw. bda-GDP im Komplex mit KRAS^{G13C}) nachzustellen. In *Fine-Screen*-Experimenten konnte jedoch kein Kristallisationswachstum festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde in einem großangelegten *Initial-Screening* eine Vielzahl von Bedingungen getestet.

Bei einer Proteinkonzentration von 70 mg/ml konnten in einer Bedingung erste kleine Kristalle beobachtet werden. Da diese jedoch zu klein für Diffraktions-Experimente waren, wurden die neu gefundenen Bedingungen in einem Feinscreen nachgestellt und weiter optimiert. Dabei wurden neben der zuvor verwendeten Proteinkonzentration von 70 mg/ml auch Konzentrationen von 50 mg/ml und 30 mg/ml bei 20 °C getestet.

In den *Fine-Screen*-Experimenten konnte bereits nach wenigen Tagen in den meisten Bedingungen für alle drei Proteinkonzentrationen Kristallwachstum beobachtet werden (Abbildung 29).

Hierbei viel auf, dass in nahezu allen Bedingungen kristallines Wachstum zu beobachten war. In den meisten Fällen bildeten sich in diesen Experimenten stark verwachsene Kristalle, die keine scharfen Kanten aufwiesen. Die erhaltenen Kristalle wurden aus den Tropfen entfernt, für anschließende Diffraktions-Experimente am SLS bzw. *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in flüssigem Stickstoff gekühlt und in einem Kryobehälter eingelagert.

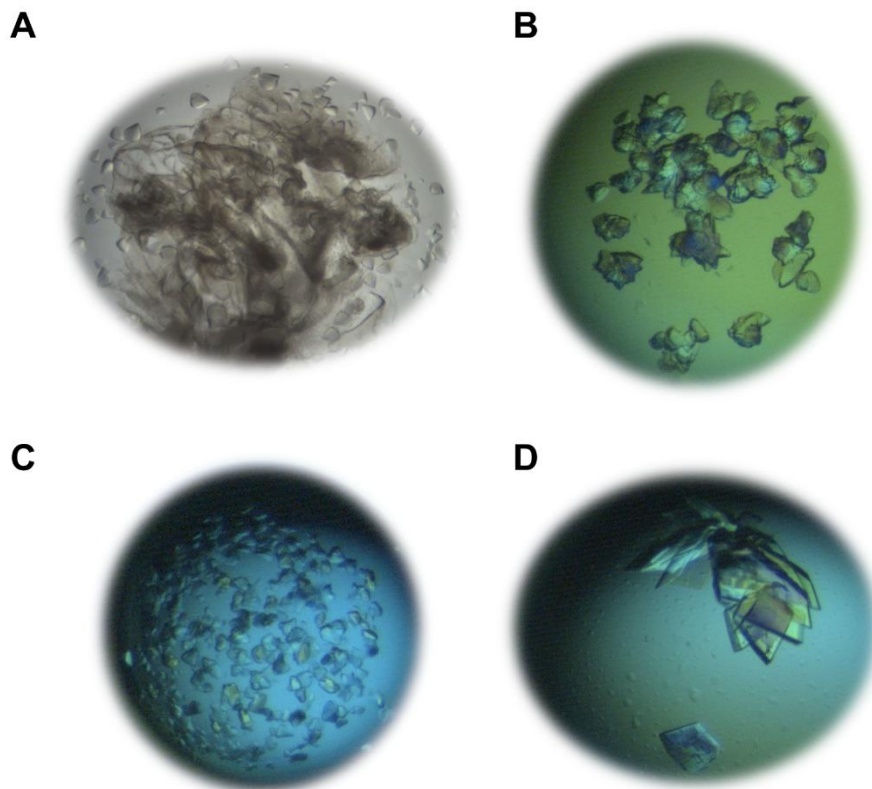


Abbildung 29. Abbildungen der erhaltenen Kristalle von KRAS^{G13C} vermeintlich im Komplex mit **15b**. **A:** Ergebnis aus initialem *Screening*; Tag1, 67 mg/ml, JSCQ Core III, B5 (0,2 M NaOAc, 30 % PEG4000, 0,1 M TRIS pH 8,5). **B - D:** Ergebnisse aus *Fine-Screenings* (30- 40 % PEG4000, 0,1 M NaOAc, 0,1 M TRIS ph 7,5 - 8,5); Proteinkonzentrationen: 70 mg/ ml (**B**), 30 mg/ml (**C**) und 50 mg/ml (**D**) nach jeweils sechs Tagen.

Es konnten erfolgreich Datensätze mit einer sehr guten Auflösung von 2,0 Å aufgenommen werden.

Nach der Prozessierung der Daten zeigten sich jedoch sehr schlechte Datenstatistiken, und es konnte keine vollständige kovalente Bindung zwischen dem Liganden **15b** und dem Protein nachgewiesen werden. Dennoch war das Linkermotiv an dem GDP-Grundgerüst gut erkenntlich (Abbildung 30).

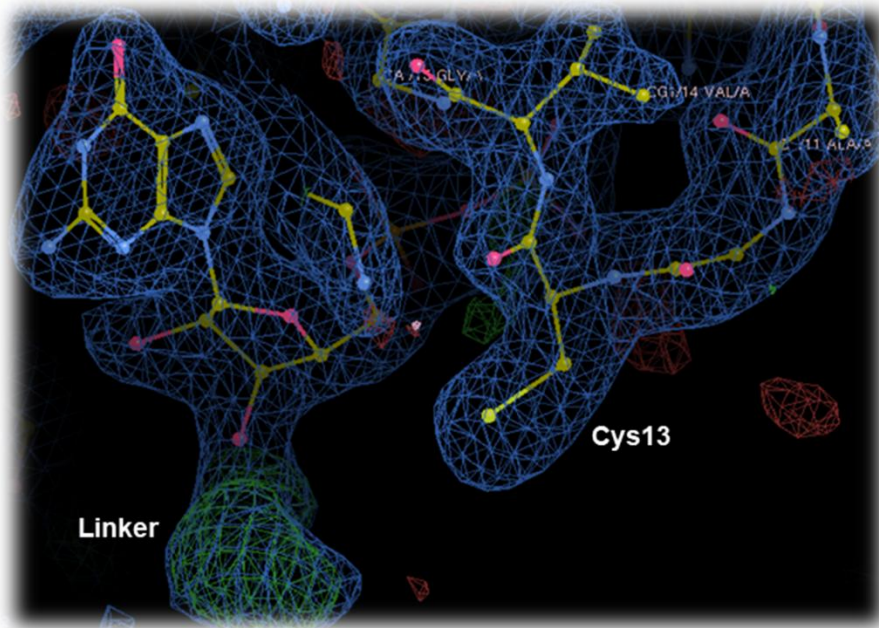


Abbildung 30. Elektronendichte von KRAS^{G13C} im Komplex mit **15b**. In grün ist die positive Differenz-Dichte des Linkers des Nukleotid-basierten Inhibitors dargestellt.

Da die erhaltenen Kristalle alle stark verwachsen waren, könnte die minderwertige Kristallqualität für die unzureichenden Datenstatistiken verantwortlich sein. Daher wurden neue Ansätze verfolgt, um Kristalle mit höherer Qualität zu erzeugen. Neben kommerziell erhältlichen *Additiv-Screenings* wurden auch verschiedene Temperaturen zur Kristallisation getestet, um die Entstehung von Kristallisationskeimen zu verlangsamen und somit Einzelkristalle zu erhalten.

Bei einer Temperatur von 18 °C und einer Zusammensetzung der Reservoir-Lösung aus 32,5 % PEG 4000, 200 mM TRIS pH 8,5, 100 mM NaOAc sowie einer Proteinkonzentration von 44 mg/ml konnte erfolgreich ein größerer Einzelkristall erzeugt werden. Von diesem Einzelkristall konnten Datensätze aufgenommen und anschließend eine Proteinstruktur im Komplex mit Verbindung **15b** ermittelt werden.¹¹

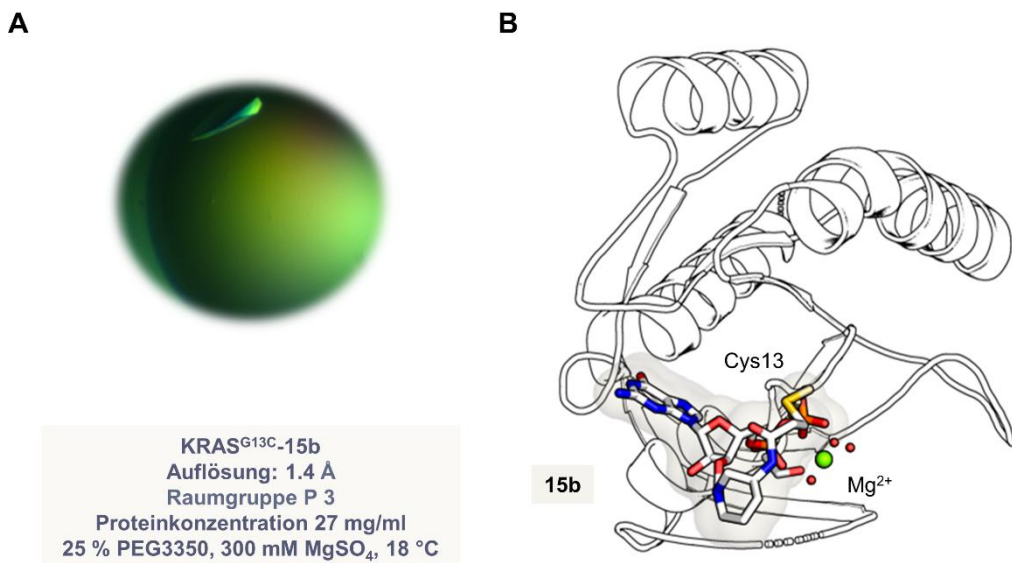


Abbildung 31. A: Kristall von KRAS^{G13C} im Komplex mit **15b** und der gefundenen, optimierten Bedingungen. **B:** Ko-Kristall Struktur von KRAS^{G13C} und **15b**.

¹¹ Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen und das Lösen der Struktur wurde von Dr. Janina Niggenaber durchgeführt.

Strukturanalyse der neu generierten Verbindung **15b**¹²

Die erhaltene Kristallstruktur bietet wertvolle Einblicke in den Bindungsmodus und das Interaktionsmuster des Liganden innerhalb des Proteins. Diese Erkenntnisse sind entscheidend für die Ableitung von Optimierungsansätzen und stellen somit ein wichtiges Werkzeug in der Medizinalchemie dar. In der ermittelten Struktur konnte die gesamte GTPase visualisiert werden und gezeigt werden, dass der zuvor synthetisierte Ligand innerhalb der GDP-Bindungstasche lokalisiert ist. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass das Molekül das Cys13 kovalent mit dem MICHAEL-Akzeptor modifiziert. Das GDP-Grundgerüst zeigt eine hohe Deckungsgleichheit mit den Strukturen von KRAS:GDP (PDB 4OBE) und der Kristallstruktur von KRAS^{G13C} im Komplex mit eda-GDP (PDB 7OK3) in der Bindungstasche. Dadurch bleiben wichtige native Interaktionen erhalten, die für die hohe Affinität von GDP verantwortlich sind. Im Vergleich zur eda-GDP (**15a**)-gebundenen Struktur ist das Mg²⁺-Ion in der aktuellen Struktur klar zu erkennen. In der Struktur 7OK3 ist dieses Mg²⁺-Ion aufgrund des in der Kristallisationslösung vorhandenen Natriumfluorids nicht vorhanden, wahrscheinlich bedingt durch die Ausfällung des schwerlöslichen MgF₂-Salzes (Abbildung 32).

¹² Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen und das Lösen der Struktur wurde von Dr. Janina Niggenaber durchgeführt.

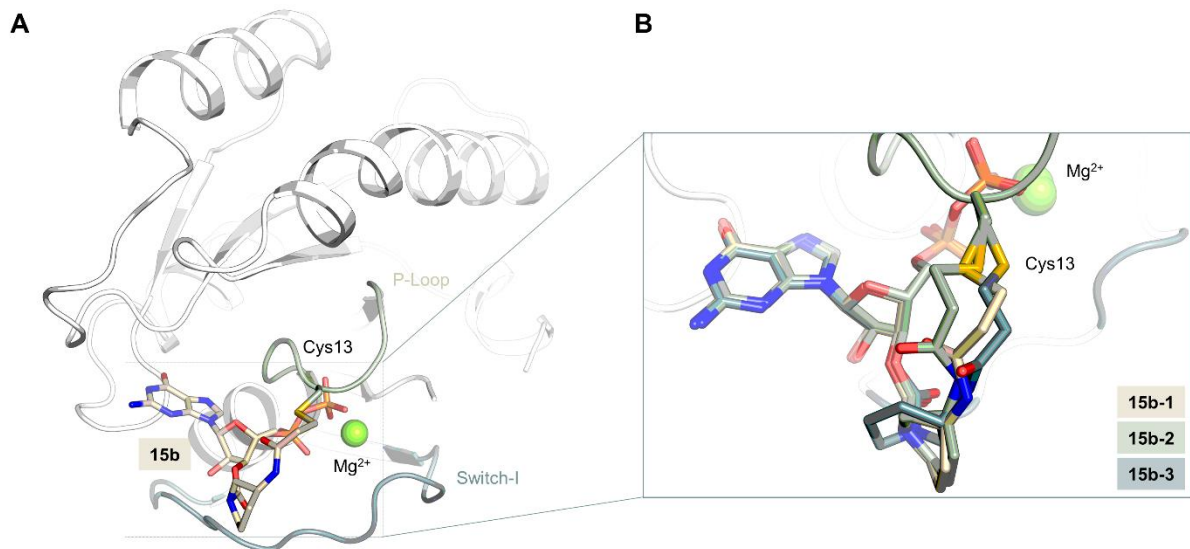


Abbildung 32. A: Ko-Kristall-Struktur von **15b** im Komplex mit KRAS^{G13C}. Wichtige Strukturelemente sind farblich hervorgehoben. **B:** Unterschiedliche Orientierungen des Linkermotivs von **15b**.

In der asymmetrischen Einheit liegen drei Proteinketten vor. Der Linker ist dabei in der Elektronendichte nur teilweise gut definiert, weshalb verschiedene Konformationen modelliert wurden. Insbesondere der Bereich in der Nähe von Cys13 weist eine hohe Flexibilität auf, was möglicherweise zu einer suboptimalen Orientierung für die kovalente Bindung führt (Abbildung 32, Abbildung 64). Diese detaillierten strukturellen Informationen sind essentiell für das Verständnis der Ligand-Protein-Interaktionen und bieten eine solide Grundlage für die Weiterentwicklung und Optimierung neuer Wirkstoffe.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel die erfolgreiche Erstellung einer kleinen Bibliothek realisiert. Dabei wurde das GDP-Grundgerüst nach dem Vorbild von GOEBEL *et al.* verwendet, wobei zyklische Linker und eine Acryloyl-Gruppe integriert werden konnten.⁹⁷ Eine neue Syntheseroute wurde entwickelt, bei der im ersten Schritt der Linker mit einer Acrylamid-Gruppe vormodifiziert und anschließend an das Nukleotid gekoppelt wurde. Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass diese Verbindungen kovalent an das Cystein der KRAS^{G13C}-Mutante binden und ein ähnliches Bindungsverhalten wie die Parentalstruktur **15a** aufweisen. Allerdings wurde keine signifikante Verbesserung der Reaktivität beobachtet, und einige Verbindungen zeigten ein schlechteres Bindungsverhalten, was wertvolle Einblicke in die bevorzugte Ausrichtung des Linkers ermöglichte. Diese Experimente offenbarten auch ein hohes Selektivitätsprofil gegenüber KRAS^{G12C} und dem Wildtyp-Protein. Zudem konnte im SOS-Austausch-Experiment bestätigt werden, dass nach Blockierung durch den kovalenten Inhibitor kein weiterer Nukleotid-Austausch stattfindet. Ein Pulldown-basierter Assay zeigte ebenfalls, dass KRAS^{G13C} nach Bindung des Inhibitors nicht mehr aktiviert werden konnte. Eine Kristallstruktur der besten Verbindung, **15b**, konnte generiert werden, wobei das GDP-Grundgerüst in der Bindungstasche ähnlich wie in anderen KRAS-Strukturen (z. B. KRAS:GDP (PDB 4OBE) und KRAS^{G13C}-**15a** (PDB 7OK3)) orientiert war. Die Strukturuntersuchungen legten nahe, dass der Linker eine erhöhte Flexibilität aufweist, was zu einer suboptimalen Ausrichtung für die kovalente Reaktion mit Cys13 führen könnte – eine Erkenntnis, die für das Design neuartiger Linker von Bedeutung sein kann. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Hugo Verli wurden Molekulardynamische (MD)-Simulationen durchgeführt, um die möglichen Konformationen der Linker vor der kovalenten Bindung zu analysieren und die Populationswahrscheinlichkeiten der reaktionsfähigen Konformationen zu bestimmen. Die Simulationen zeigten, dass die prozentuale Wahrscheinlichkeit, dass die Verbindungen **15a**, **15b** und **15c** in eine Orientierung gelangen, welche kovalent mit dem Cys13 reagieren kann ähnlich aber grundsätzlich gering ist. Dies erklärt möglicherweise die niedrige Modifikationsrate bei physiologischem pH-Wert.

Diese Simulationen könnten ein wertvolles Werkzeug für die Entwicklung von Linkern darstellen, die eine verbesserte Präorientierung des *warheads* und eine optimierte Reaktivität gegenüber Cys13 aufweisen (Abbildung 65).

Zukünftige Studien sollten sich auf die Bestimmung des pK_a -Werts von Cys13 im Vergleich zu Cys12 konzentrieren, um die relative Reaktivität besser abschätzen zu können. Es ist denkbar, dass die Nähe der negativ geladenen Phosphatgruppen eine negative Ladung am Cys13 unwahrscheinlich macht, was für die MICHAEL-artige Reaktion wichtig wäre. In diesem Zusammenhang könnten reaktivere *warheads* helfen, die Gesamtreaktivität zu steigern. Ein weiteres wichtiges Ziel für künftige Studien ist die Bewertung der zellulären Potenz dieser Verbindungen. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen ist es unwahrscheinlich, dass die Moleküle die Zellmembran überwinden können. Das sogenannte *Prodrug*-Konzept könnte hier eine Lösung bieten: Durch eine chemische Maskierung der negativen Ladung ließe sich die Zellgängigkeit erhöhen, wobei die Maskierung nach Eintritt in die Zelle durch unspezifische Esterasen abgespalten würde, um die aktive Form des Inhibitors freizusetzen.^{127, 128}

Kovalente Adressierung von KRAS^{G13C} mit niedermolekularen Verbindungen

Auf Grundlage des im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Konzepts konnte erstmals demonstriert werden, dass Cys13 mittels eines kovalent reagierenden Moleküls spezifisch in Mutanten adressiert werden kann.⁹⁷ Da die eingesetzten GDP-Analoga jedoch Einschränkungen hinsichtlich ihrer Zellgängigkeit aufweisen und in diesem Zusammenhang einer weiteren Optimierung bedürfen, stellt die gezielte Adressierung von KRAS^{G13C} über die sogenannte SWIIP eine vielversprechende Alternative dar. Frühere Studien haben bereits überzeugend gezeigt, dass durch den Einsatz eines hochaffinen Grundgerüsts, das vom Molekül MRTX1133 (**2**) abgeleitet ist, andere Mutanten, neben G12C, sowohl reversibel als auch kovalent selektiv über diese Tasche adressiert werden konnten. In diesen Fällen wurde das Grundgerüst, das auf seine reversible Affinität hin optimiert wurde, jeweils mit einer funktionellen Gruppe modifiziert, die spezifisch mit der mutierten Aminosäure reagiert oder interagiert.^{71, 129} In Anlehnung an diese erfolgreichen Ansätze, die das Codon 12 im P-Loop adressieren, soll in diesem Kapitel nach einem vergleichbaren Konzept das Cys13 kovalent adressiert werden, welches sich nur eine Position von Codon 12 entfernt befindet. Da Cys13 im Vergleich zu Cys12 weiter von der SWIIP entfernt liegt, wird ein verlängerter Linker eingefügt, um die räumliche Distanz zwischen Codon 12 und 13 zu überbrücken. Im Jahr 2023 berichtete GENENTECH INC. erstmals über Moleküle, die nach einem ähnlichen Prinzip die G13-Mutante gezielt adressieren. Analog zu dem Molekül MRTX1133 (**2**)⁷⁸, welches reversibel an die G12D-Mutante bindet, wurde durch die Einführung eines Linkermotivs ein basisches Amin in das Molekül integriert. Dieses sollte eine Salzbrücke mit dem mutierten Asp13 bilden, um so einen Selektivitätsvorteil gegenüber dem Wildtyp zu erzielen. Hierbei wurde das von GENENTECH INC. entwickelte Grundgerüst des KRAS^{G12C}-Inhibitors Divarasib (**16**)¹³⁰ verwendet. Erste Studien konnten zeigen, dass der inaktive, GDP-gebundene Zustand von KRAS^{G13D} selektiv gegenüber dem Wildtyp adressiert werden kann. Darüber hinaus bestätigten Ko-Kristallstudien, dass die Verbindungen 35 (**17**) und 36 (**18**) eine ähnliche Orientierung wie die parentalen Moleküle einnehmen und die gewünschte Salzbrücke zu Asp13 ausbilden.¹³¹

Dieses Beispiel belegt, dass neben G12X-mutierten KRAS-Varianten auch die Adressierung von KRAS^{G13X} mit Hilfe von allosterischen Modulatoren, welche in die SWIIP binden, möglich ist.

Design und Docking-Studien der neuartigen KRAS^{G13C} Inhibitoren

Das Design der KRAS^{G13C}-Inhibitoren basierte auf dem Grundgerüst von MRTX1133 (**2**), welches aufgrund seiner optimierten reversiblen Affinität als Leitstruktur diente. Das Pyridopyrimidin-Grundgerüst trägt selbst durch die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr64 und Arg68 wesentlich zur Bindungsaffinität bei. Zudem vermittelt die Aminogruppe an der 2'-Position eine wichtige Salzbrücke mit der sauren Seitenkette der Aminosäure Glu62. Ein bizyklischer Rest an der 7'-Position besetzt eine tiefere Tasche im Inneren des Proteins und tritt dort in starke hydrophobe Wechselwirkungen. An der 4'-Position befindet sich eine funktionelle Gruppe, die in der Lage ist, spezifische Interaktionen mit dem mutierten Codon 12 einzugehen.⁷⁸ An dieser Position soll ein verlängernder Linker, analog zu den Verbindungen 35 und 36 (**17**, **18**), eingeführt werden. Dieser Linker wird zusätzlich mit einem MICHAEL-Akzeptor ausgestattet, um eine kovalente Bindung mit dem erworbenen Cys13 zu ermöglichen (Abbildung 33).

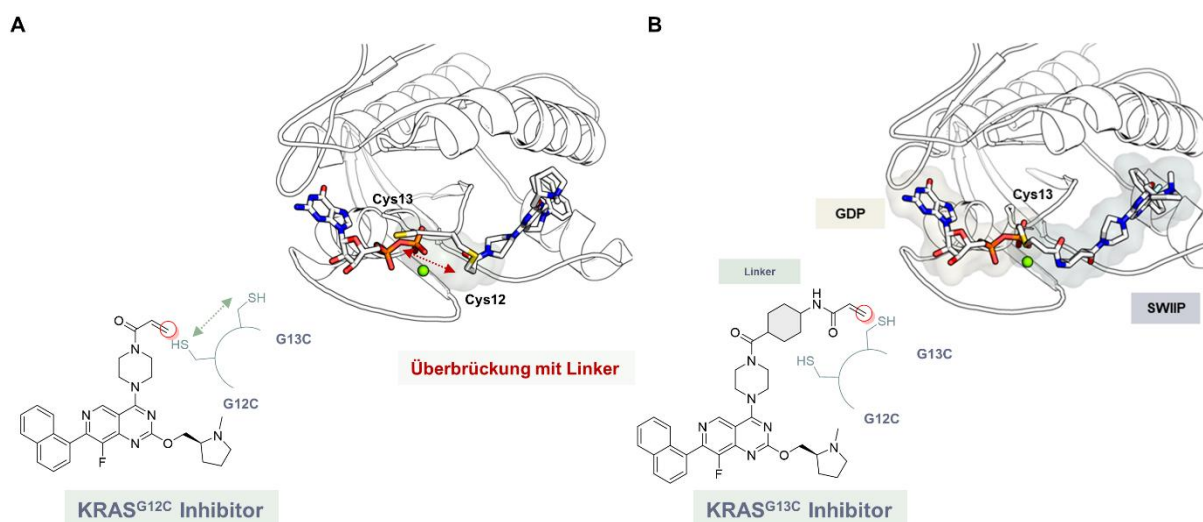


Abbildung 33. A: Chemische Struktur eines G12C-Inhibitors. Erweiterung des Linkers, um die Distanz zwischen dem Cys12 und Cys13 zu überwinden. (PDB 6UT0). **B:** Vermeintlicher KRAS^{G13C}-Inhibitor mit integriertem Linker. Docking-Pose in GOLD generiert, basierend auf PDB 7RPZ.

Da für die KRAS^{G13C}-Mutante keine öffentlich zugängliche Kristallstruktur existiert, in der die SWIIP ausgebildet ist, wurde die Kristallstruktur von KRAS^{G12D} im Komplex mit MRTX1133 (**2**) (PDB 7RPZ) verwendet. Die Mutationen G12D sowie G13C wurden manuell mutiert, um ein Modell zu generieren, das für Distanzmessungen und erste *Docking*-Studien genutzt werden sollte. Dieses Modell diente dazu, die geeignete Länge des Linkers zu ermitteln. Dazu wurde die Distanz zwischen der Aminogruppe des Piperazins und der Thiolgruppe von Cystein 13 gemessen. Bekannte Moleküle wurden entsprechend mit einem Linker verlängert und mit einem *warhead* ausgestattet, der eine kovalente Bindung ermöglichen sollte.

Die modifizierten Moleküle wurden anschließend für kovalente *Docking*-Studien aufbereitet und in der Software GOLD gedockt. Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswertung der erhaltenen *Docking*-Ergebnisse war, dass die Positionierung des Grundgerüsts sowie der Gruppen, die mit bekannten Inhibitoren identisch sind, nicht zu stark voneinander abweichen. Diese Gruppen wurden bereits in früheren Studien ausführlich variiert und evaluiert, sodass keine weiteren Änderungen an ihnen vorgenommen werden sollten.

Ein unzureichend oder übermäßig langer Linker könnte zu einer Fehlorientierung der etablierten Strukturelemente führen, was es zu vermeiden galt.

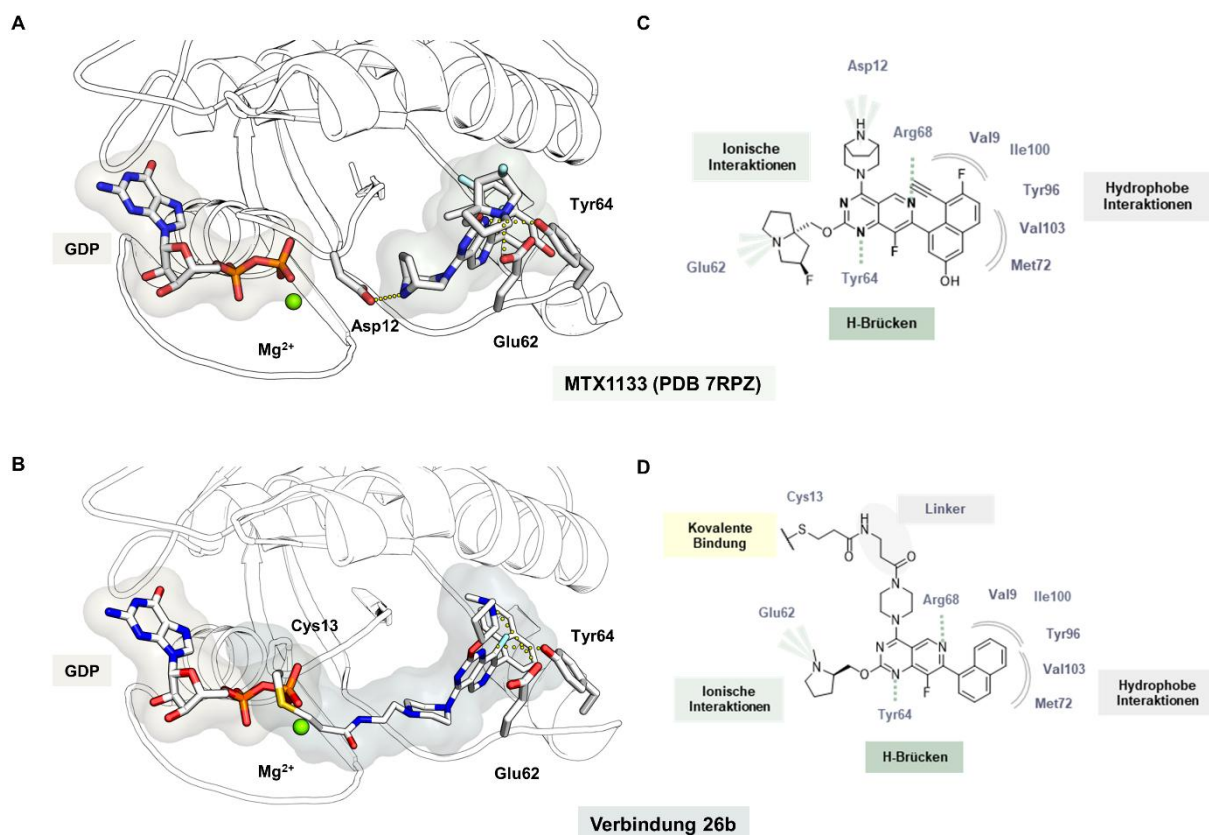


Abbildung 34. **A:** Ko-Kristallstruktur von MRTX1133 (**2**) (grün) reversibel gebunden in KRAS^{G12D}. **B:** Docking-Pose von Molekül **26b** (grau) kovalent gebunden in KRAS^{G13C}. **C:** Interaktionsprofil von MRTX1133 (**2**). **D:** Interaktionsprofil von Molekül **26b**.

In Abbildung 34 ist beispielhaft das *Docking*-Ergebnis für das Molekül **26b** vergleichend mit **2** dargestellt. Es ist ersichtlich, dass das erworbene Cys13 kovalent modifiziert vorliegt und die Moleküle nahezu deckungsgleich zu MRTX1133 (**2**) in der Bindungstasche orientiert sind. Anschließend konnte das Interaktionsmuster der beiden Verbindungen mit dem Protein näher untersucht werden: Zum einen bildet sich eine wichtige Salzbrücke zwischen dem tertiären Amin und Glu62 aus. Zudem befindet sich der aromatische Bicyklus in der hydrophoben Tasche, die von den Aminosäuren Val9, Ile100, Tyr96, Val103 und Met72 aufgespannt wird. Der Bicyklus ist dabei zum Grundgerüst verdreht. Das Grundgerüst interagiert weiterhin über Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren Tyr64 und Arg68. Der Linker selbst geht keine weiteren Interaktionen ein, was in zukünftigen Optimierungsversuchen noch verbessert werden könnte, um die Affinität zu erhöhen und eine optimale Ausrichtung der elektrophilen Gruppe zu gewährleisten.

Dennoch ist die Länge des Linkers ausreichend und geeignet, um das Cys13 zu erreichen, ohne dass das Molekül in der Bindungstasche verzerrt vorliegt.

Da geeignete Linkermotive in den *Docking*-Studien gefunden werden konnten (Abbildung 66), galt es im nächsten Schritt die Moleküle über organische Synthesen darzustellen und dafür geeignete und robuste Syntheserouten zu etablieren. Für einige der zuvor designten Moleküle konnten in den *Docking*-Studien keine positiven Ergebnisse erlangt werden, was an einer nicht geeigneten Länge oder einer zu starken Rigidität des Linkers liegen kann. Dennoch sollten auch diese Moleküle synthetisch dargestellt werden, um diese Hypothese experimentell zu untersuchen und Rückschlüsse über eine optimale Linkerbeschaffenheit ziehen zu können.

Synthetische Darstellung der neuartigen KRAS^{G13C} Inhibitoren¹³

Ausgehend von den strukturellen Erkenntnissen wurde eine retrosynthetische Analyse durchgeführt, um eine möglichst effiziente Synthesestrategie zu entwickeln und anschließend zu etablieren. Dabei wurde besonderer Wert auf die Auswahl chemoselektiver Reaktionen gelegt und sichergestellt, dass reaktive Gruppen untereinander kompatibel sind. Zudem wurden geeignete Schutzgruppen berücksichtigt, die sich für den Syntheseweg als vorteilhaft erweisen.¹³²⁻¹³⁴

In Abbildung 35 sind zwei denkbare Synthesestrategien zur Darstellung des Zielmoleküls **A** gezeigt. Ausgangspunkt ist dabei ein tri-chloriertes Pyridopyrimidin (**B**), das durch verschiedene Reaktionen modifiziert werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten können die 2'- und 4'-Position des Moleküls über eine nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) selektiv mit einem Amin (**E**) und einem Alkohol (**D**) reagieren, um die Motive an den gewünschten Positionen einzuführen.

¹³ Die Synthese erfolgte in Zusammenarbeit mit Leon-Heinrich Hauernert, Maria Beerbaum und teilweise im Rahmen der Bachelorarbeit von Erja Schube (SS 2024).

Im ersten Ansatz (Synthesestrang I) kann an den Baustein **E1** über verschiedene Reaktionstypen (bspw. Amidkupplungen oder nukleophile Substitution) das Linkermotiv **E2** angefügt werden, welches zusätzlich mit einer elektrophilen Gruppe (*warhead*) dekoriert ist. **E2** könnte in diesem Fall als Säure oder Halogenid über eine Amidkupplung oder nukleophile Substitution an das entschützte Piperazin **E1** angebracht werden. Diese Methode ermöglicht eine späte Derivatisierung des Linkermotivs. Alternativ kann das Linkermotiv, das bereits an ein Piperazin gekoppelt ist (**E**), in einem ersten Schritt an Position 4 substituiert werden, wodurch eine spätere Modifikation an den Positionen 2 und 7 ermöglicht wird (Synthesestrang II). In diesem Fall würde ein maskiertes Amin **E** im Syntheseverlauf entschützt werden, um den MICHAEL-AKZEPTOR an dieser Position einführen zu können. Zudem kann die Position 7 durch eine SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung mit einer Biaryl-Boronsäure (Baustein **C**) weiter modifiziert werden (Abbildung 35).

Diese retrosynthetischen Strategien bilden die Grundlage für die systematische Untersuchung der Reaktionsbedingungen und die Optimierung der Synthese der Zielmoleküle.

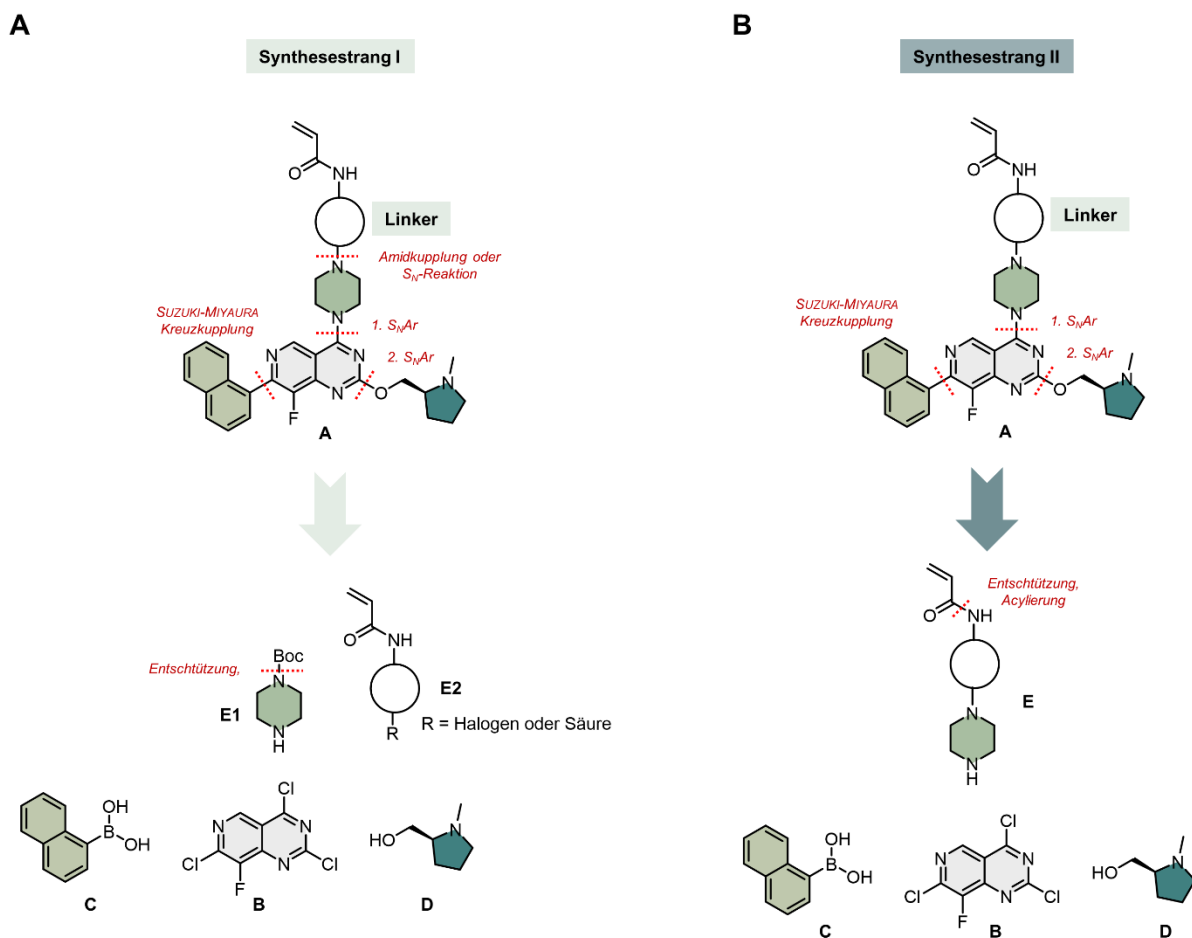


Abbildung 35. Retrosynthetische Untersuchung der zentralen Verbindung **A** über zwei unterschiedliche Synthesestränge. Ausgangspunkt stellt das trichlorierte Pyridopyrimidin Gerüst **B** dar, welches über mehrere Schritte modifiziert wird.

In einem ersten Ansatz wurde Synthesestrang I ausgewählt, da diese Strategie eine späte Derivatisierung des Linkermotivs ermöglicht. Zunächst wurde die Syntheseroute gemäß den Literaturbedingungen von WANG *et al.* linear durchgeführt. Im abschließenden Schritt sollte die Entschützung der Aminogruppe des Piperazin-Motivs erfolgen, um das freie Amin zu erhalten. Dieses kann anschließend zur Verknüpfung mit einem Linker verwendet werden, der einen MICHAEL-Akzeptor trägt (Abbildung 36).

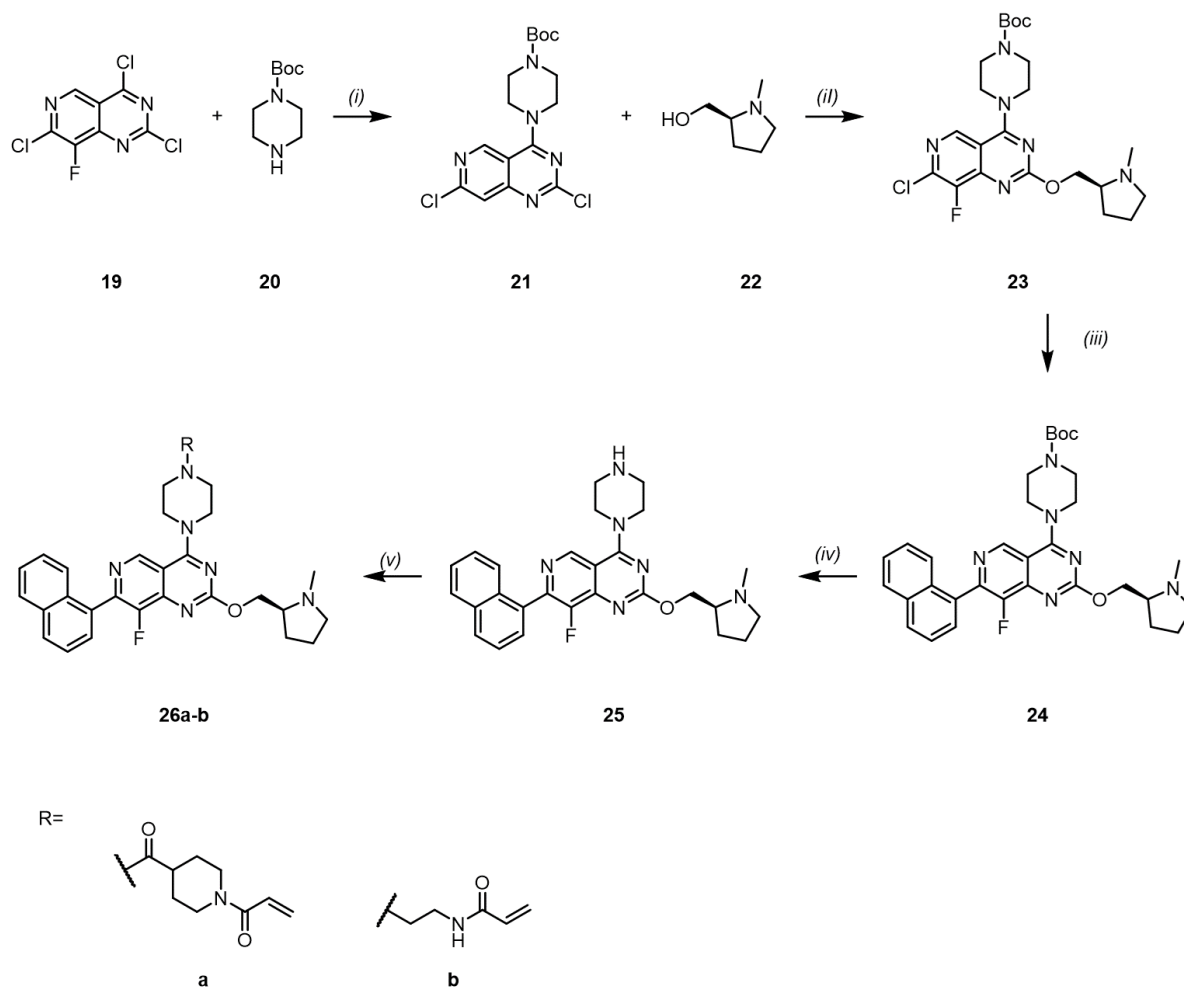


Abbildung 36. Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der Moleküle **26a-b**. (i) S_NAr ; (ii) S_NAr ; (iii) SUZUKI-MIYAUURA -Kupplung; (iv) Entschützung; Amidkupplung oder nukleophile Substitution.

Ausgehend vom 2,4,7-Trichloro-8-fluoropyrido[4,3-d]pyrimidin (**19**), welches im ersten Schritt mit dem Boc-geschützten Piperazin (**20**) unter Zugabe der Base DIPEA (**27**) umgesetzt wird. Ohne Zwischenaufarbeitung wurde im zweiten Schritt der Alkohol (**22**) zugegeben, der die 2'-Position modifizierte (Abbildung 37). Die Selektivität dieser Reaktionen ist auf zwei Faktoren zurückzuführen. Zum einen spielen die unterschiedlichen Kohlenstoff-Chlor Bindungsenergien ($C_2-Cl = 94,9 \text{ kcal/mol}$; $C_4-Cl = 93,8 \text{ kcal/mol}$)¹³⁵ der relevanten Positionen im Ausgangsmaterial **19** eine entscheidende Rolle. Zum anderen wird die Reaktionsselektivität durch die präzise Steuerung der Reaktionstemperaturen gewährleistet, was eine gezielte Substitution der gewünschten Positionen ermöglicht.

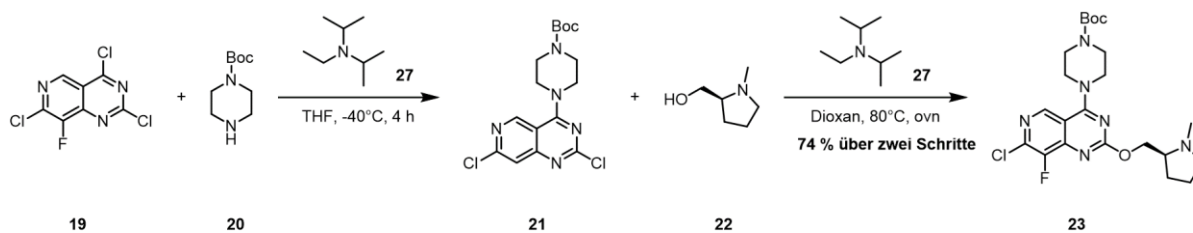


Abbildung 37. Syntheschema zur Darstellung von **23** ausgehend von **19** über zwei aufeinanderfolgende S_NAr .

Anschließend wurde die Modifikation der 7'-Position durch eine SUZUKI-MIYAUURA-Kupplungsreaktion durchgeführt. Dabei kam der aromatische Bicyklus in Form der Boronsäure **28** zum Einsatz, wobei auch die Einführung strukturell diverserer Substituenten an dieser Position denkbar ist (Abbildung 38). Im ersten Schritt der SUZUKI-MIYAUURA-Kupplungsreaktion, der oxidativen Addition, entsteht eine Organopalladium(II)-Spezies durch die Addition des Pd(0)-Katalysators an das Halogen der Verbindung **23**. In einem anschließenden Schritt interagiert das entstehende Zwischenprodukt mit der Base K_2CO_3 , was zur Freisetzung des Halogenids führt und die Bildung einer intermediären Organopalladium-Spezies ermöglicht. Diese reagiert im Zuge der Transmetallierungsreaktion mit dem Boronat, was zur Bildung einer substituierten Organopalladium(II)-Spezies führt. Im abschließenden Schritt, der reduktiven Eliminierung, wird das gewünschte Produkt **24** freigesetzt und der Pd(0)-Katalysator regeneriert.^{136, 137}

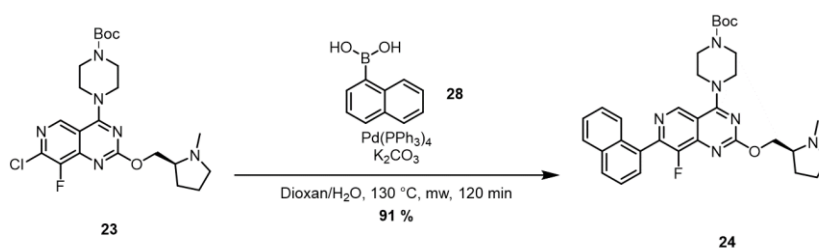


Abbildung 38. Syntheschema zur Darstellung des Intermediats **24** ausgehend von **23** über eine SUZUKI-MIYAUURA -Kupplung.

Final wurde eine Entschützung des Amins der zentralen Verbindung **24** vollzogen. Das freie Amin ermöglicht im weiteren Verlauf die Einführung des Linkers, welcher weiter mit einem MICHAEL-Akzeptor dekoriert werden soll (Abbildung 39). Die Entschützung erfolgte unter TFA-sauren Bedingungen und führte zur Freisetzung des freien Amins.

Dabei wird durch die Protonierung des Carbonyl-Sauerstoffs die Abspaltung der Carbamat-Gruppe eingeleitet. Dies bewirkt eine intramolekulare Elektronenverschiebung innerhalb der C-O-Bindung des *tert*-Butylrestes, wodurch ein *tert*-Butyl-Carbenium-Ion entsteht. Dieses wird durch Protonenübertragung zu Isobuten und Carbamatsäure umgelagert. Letztere zerfällt schließlich in Kohlenstoffdioxid und das freie Amin.¹³⁸ Die Ausbeute der Reaktion betrug anfangs lediglich 17 %, was die Notwendigkeit unterschiedlicher Maßnahmen zur Erhöhung der Ausbeute erforderte. Durch eine initiale Absenkung der Temperatur des Eduktes (**24**) auf 0 °C sowie die langsame Zugabe von verdünnter TFA konnte die Reaktionskinetik gehemmt werden, wodurch die Isolierung von Verbindung **25** mit einer verbesserten Ausbeute von 57 % ermöglicht wurde. Eine weitere Reduktion der anfänglichen Temperatur auf -40 °C führte zu einer zusätzlichen Erhöhung der Ausbeute auf 68 %. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass bei einer Reaktionszeit von mehr als einer Stunde kein Produkt detektiert werden konnte, was vermutlich auf eine Degradation des Reaktionsprodukts zurückzuführen ist.

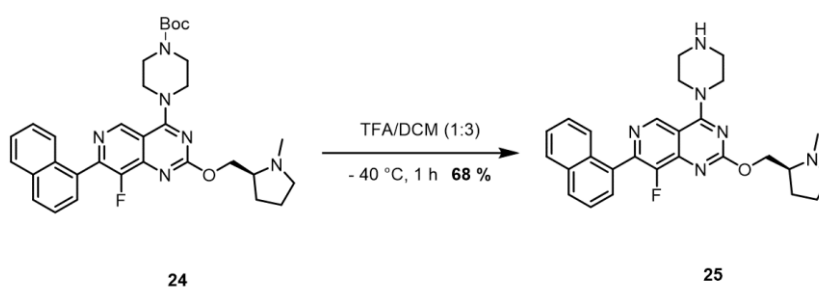


Abbildung 39. Syntheschema zur Darstellung der zentralen Verbindung **25** über eine TFA-saure Entschützung.

Molekül **25** stellt einen zentralen Baustein dar, der im weiteren Verlauf der Synthesesequenz weiter mit dem Linker und der elektrophilen Gruppe modifiziert werden soll. Hierbei kann das freie Amin bspw. über eine Amidkupplung oder eine nukleophile Substitution funktionalisiert werden.

Im Rahmen eines ersten Versuchs zur Einführung des Bausteins **30** als Linker wurde eine nukleophile Substitution unter basischen Bedingungen untersucht. Verschiedene Reaktionsparameter wurden getestet, darunter zwei unterschiedliche Basen - DIPEA und K_2CO_3 (jeweils in dreifacher Äquivalentmenge) - sowie unterschiedliche Reaktionstemperaturen.

Erst bei erhöhter Temperatur und der Verwendung von K_2CO_3 als Base konnte in der LC-MS-Analyse die Umwandlung des Edukts in das Zielprodukt detektiert werden. Dabei wurde jedoch eine Vielzahl von Nebenprodukten beobachtet, insbesondere die hydrolysierte Spezies an der 2'-Position. Dies erschwerte die Aufreinigung und Isolierung des Zielprodukts erheblich.

Ein weiterer Ansatz bestand darin, das freie Amin durch eine Amidkupplungsreaktion mit dem gewünschten Linkermotiv zu derivatisieren. In diesem Fall wurden DIPEA als Base sowie die Kupplungsreagenzien HATU und TBTU getestet. Während mit HATU die Zielmolekülmasse detektiert werden konnte, entstand auch hier hauptsächlich das hydrolysierte Nebenprodukt. Mehrere Versuche der Reinigung mittels Säulenchromatographie führten ebenfalls nicht zur Isolierung des gewünschten Produkts. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde schließlich eine alternative Syntheseroute gewählt (Abbildung 40).

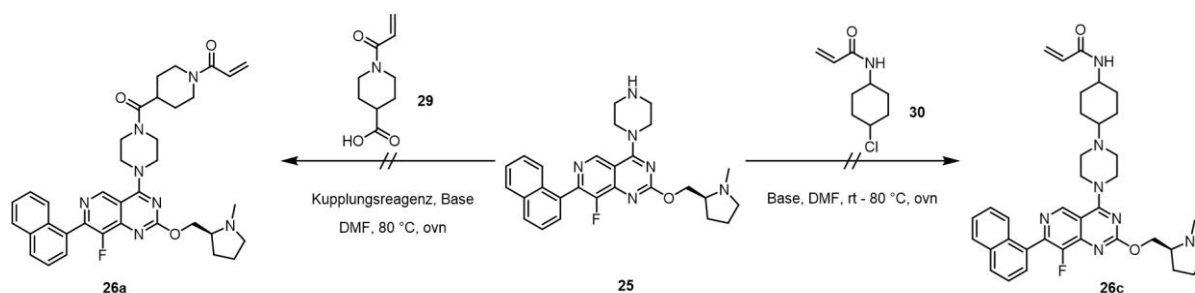


Abbildung 40. Syntheschema zur Darstellung der finalen Struktur **26a** über eine Amidkupplungs-Reaktion mit dem Baustein **29** oder der finalen Struktur **26c** über eine nukleophile Substitution mit Baustein **30**.

Alternativ wurde auf den Synthesestrang B zurückgegriffen, der bereits in der retrosynthetischen Analyse beschrieben wurde. Diese Strategie zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass das Linkermotiv bereits im ersten Syntheseschritt eingeführt wird. Diese Route wird als weniger präferiert angesehen, da zunächst das Linkermotiv variiert werden soll, um die optimalen Bedingungen hinsichtlich der Distanz, Rigidität der Linker und Ausrichtung des *warheads* zu untersuchen. Durch diese Herangehensweise erfolgt die Derivatisierung nicht in einem möglichst späten Schritt, was effizienter wäre. Dennoch bietet diese Strategie die Möglichkeit, das bislang nicht erfolgreiche Einbringen des Linkermotivs an der 4'-Position zu realisieren und somit die kritische Reaktion zu umgehen (Abbildung 41).

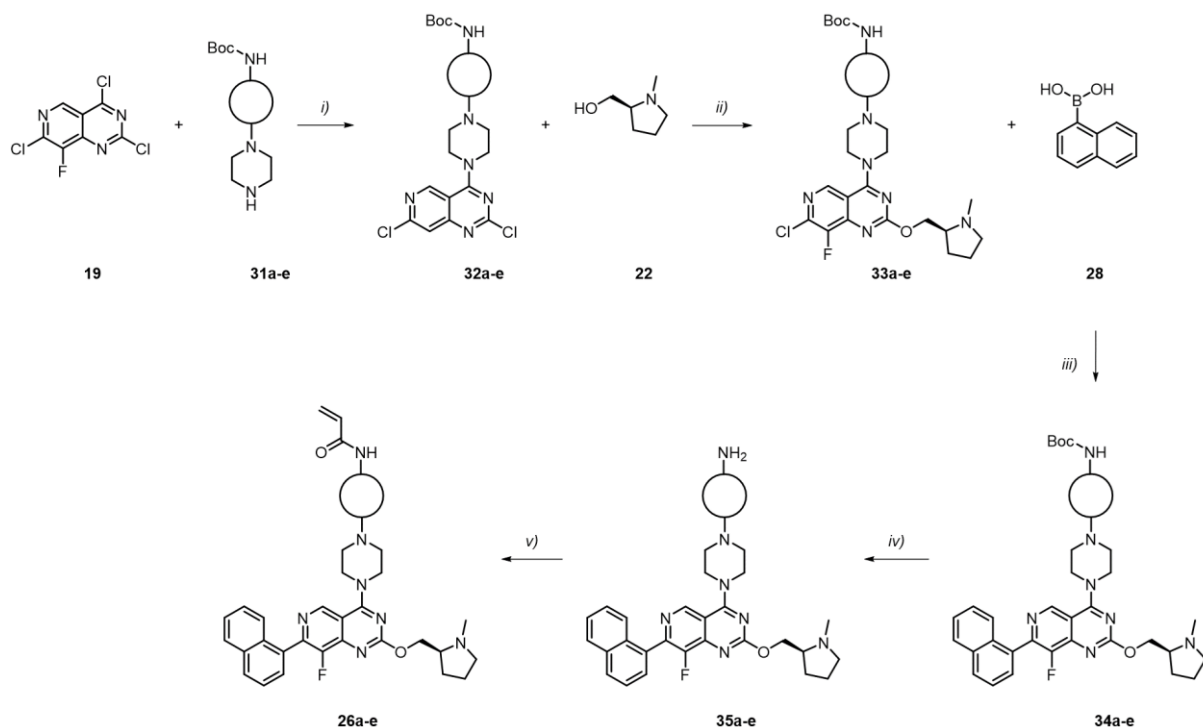


Abbildung 41. Etablierte Syntheseroute zur Einführung des Linkers im ersten Schritt. *i)* Nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) mit Boc-Linker-Piperazin; *ii)* S_NAr mit Alkohol; *iii)* *SUZUKI-MIYAUURA*-Kupplung mit Naphthalin-Boronsäure; *iv)* Entschützung durch TFA; *v)* Acylierung mit Acryloylchlorid.

So wurde ähnlich wie in der ersten beschriebenen Route im ersten ein modifiziertes, Boc-geschütztes Piperazin-Derivat (**31a-e**), das als Linkermotiv dienen soll verwendet. Die Synthese beginnt mit zwei nukleophilen aromatischen Substitutionen, wobei die Reagenzien nacheinander und ohne anschließende Aufreinigung zur Herstellung der Verbindungen **33a-e** hinzugefügt werden. Der Ausgangsstoff für diese Reaktion ist das 2,4,7-Trichloro-8-fluoropyrido[4,3-d]pyrimidin (**19**), das im ersten Schritt mit dem Boc-geschützten Piperazinmotiv (**31a-e**) in einer S_NAr -Reaktion zu den Verbindungen **32a-e** umgesetzt wird. In diesem Schritt greift das Nukleophil (**31a-e**) selektiv die C4-Position an. Anschließend erfolgt eine weitere S_NAr -Reaktion mit dem Alkohol (**22**), der selektiv die C2-Position nukleophil angreift. Auf diese Weise konnten die Verbindungen **33a-e** über zwei Schritte mit moderaten bis sehr guten Ausbeuten von 16 - 98 % synthetisiert werden (Abbildung 42).

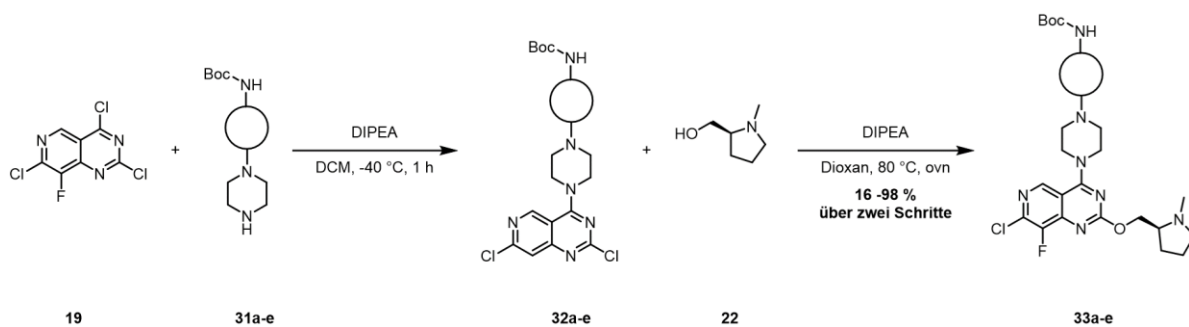


Abbildung 42. Syntheschema zur Darstellung von **33a-e** ausgehend von **19** durch zwei aufeinanderfolgende nukleophile aromatische Substitutionen.

Im nächsten Schritt wurde eine Palladium-katalysierte SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung durchgeführt, bei der der Chlor-Substituent an der C7-Position durch einen Naphthalin-Substituenten ersetzt wurde. Diese wurde nach initialen Optimierungsversuchen in der Mikrowelle bei 130 °C durchgeführt und das Produkt **34a-e** konnte in moderaten Ausbeuten erhalten werden (Abbildung 43).

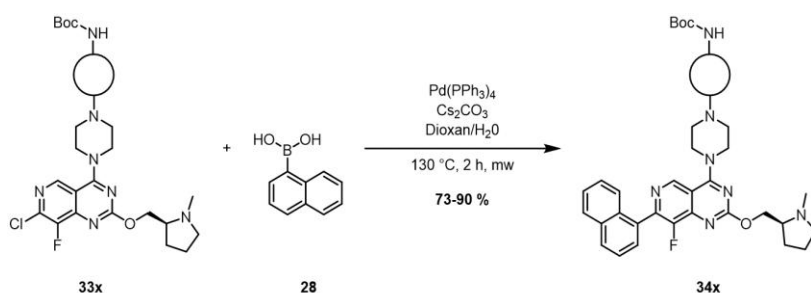


Abbildung 43. Syntheschema zur Darstellung von **34a-e** durch eine SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung von **33a-e** und der Boronsäure **28**.

Anschließend erfolgt die Entschützung von **34a-e**, um anschließend den MICHAEL-Akzeptor an das freie Amin **35a-e** einführen zu können (Abbildung 44).

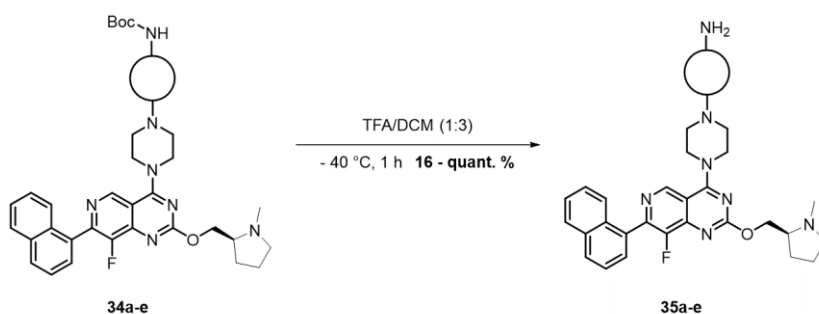


Abbildung 44. Syntheschema zur Darstellung des freienamins **35a-e** durch Entschützung von **34a-e**.

Im nächsten Schritt der Synthese sollte das freie Amin (**35a-e**) durch Acylierung mit Acryloylchlorid zu dem entsprechenden Acrylamid-Derivat (**26a-e**) umgesetzt werden. Dieser Schritt dient der Einführung des MICHAEL-Akzeptors (Abbildung 45).

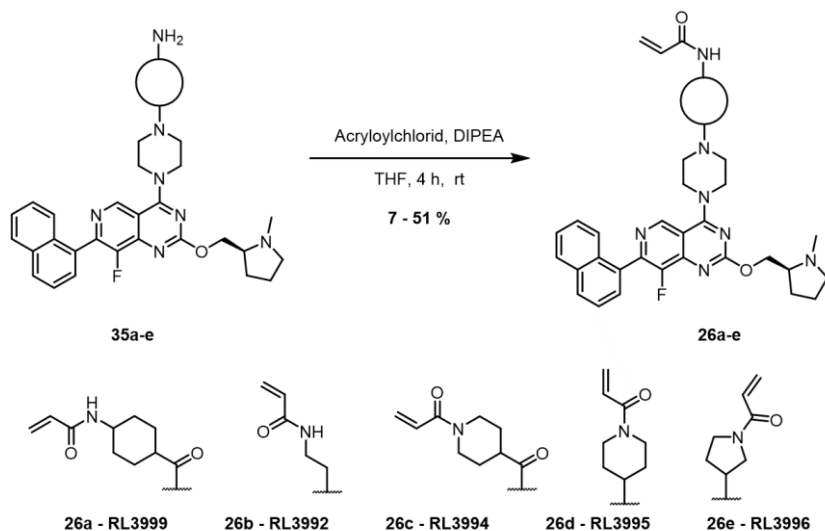


Abbildung 45. Syntheschema zur Darstellung der Produkte **26a-e** durch Acylierung von **35a-e**.

Da ein optimiertes Substitutionsmuster von MRTX1133 (**2**) an den Positionen 2', 4' und 7' bereits bekannt ist und im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der besseren synthetischen Zugänglichkeit nur vereinfachte Derivate hergestellt wurden, sollte im abschließenden Schritt das kommerziell erworbene Molekül **2** durch eine Amidkupplung mit dem in *Docking*-Studien als optimal identifizierten Linker (Linkermotiv c) modifiziert werden. Hierzu wurde **2** mit DIPEA sowie dem Kupplungsreagenz HBTU und der Säure **29** versetzt. Obwohl in dieser Reaktion nur geringe Ausbeuten erzielt werden konnten, gelang es dennoch, die Verbindung **36** auf diesem Weg zu synthetisieren und zu isolieren (Abbildung 46).

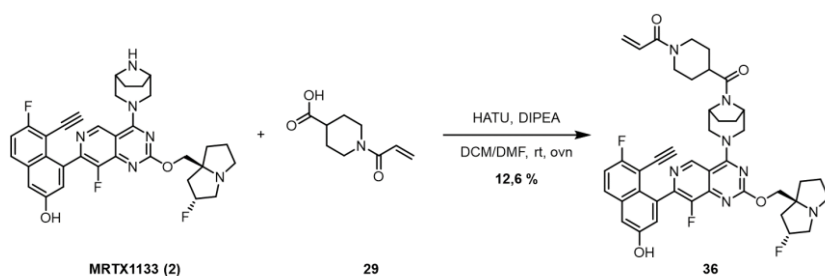


Abbildung 46. Syntheschema der Amidkupplungs-Reaktion der finalen Verbindung **36** ausgehend von dem kommerziell erhältlichen MRTX1133 (**2**).

Insgesamt konnte für diese neuartigen kovalenten Inhibitoren eine erfolgreiche Syntheseroute mit moderaten Ausbeuten entwickelt werden. Diese Syntheseroute ermöglicht nicht nur die Integration unterschiedlicher Linkermotive, sondern erlaubt auch weitere Derivatisierungen, um die molekularen Eigenschaften der Inhibitoren gezielt zu optimieren.

Massenspektrometrische Untersuchungen

Der erste Schritt der Untersuchung der neu erhaltenen Verbindungen stellt die massenspektrometrische Analyse dar, um eine kovalente Modifikation von Cys13 der vermeintlichen Inhibitoren nachzuweisen.

In einem ersten Experiment wurden die erhaltenen Inhibitoren für 24 h bei rt mit dem Protein KRAS^{G13C} (*Cys-light*) bei einem pH-Wert von 9,5 inkubiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Das Proteinkonstrukt zeichnet sich dadurch aus, dass alle Cysteine, ausgenommen das an Position 13, mutiert wurden. Wird eine Massenverschiebung um die jeweilige Masse des Inhibitors vernommen, so kann davon ausgegangen werden, dass die Verbindung das Cys13 des Proteins kovalent modifiziert. Aus vorangegangenen Studien besteht die Vermutung, dass das Cys13 - im Gegensatz zu Cys12 - weitaus weniger reaktiv ist, weshalb sich auch das kovalente Modifizierungsverhalten bei höheren pH-Werten angeschaut wurde. Dies mag darin begründet liegen, dass der pK_a-Wert des Cys13 sich von Cys12 unterscheidet, da das Codon 13 sich näher am der Nukleotid-Bindetasche lokalisiert ist, wo sich aufgrund der Phosphate von GDP bzw. GTP eine erhöhte negative Ladungsdichte befindet. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment zu dem Modifikationspuffer EDTA hinzugegeben, um die Bindung von GDP zu destabilisieren und somit eine mögliche kovalente Bindung an das Protein zu fördern.

Ergebnisse

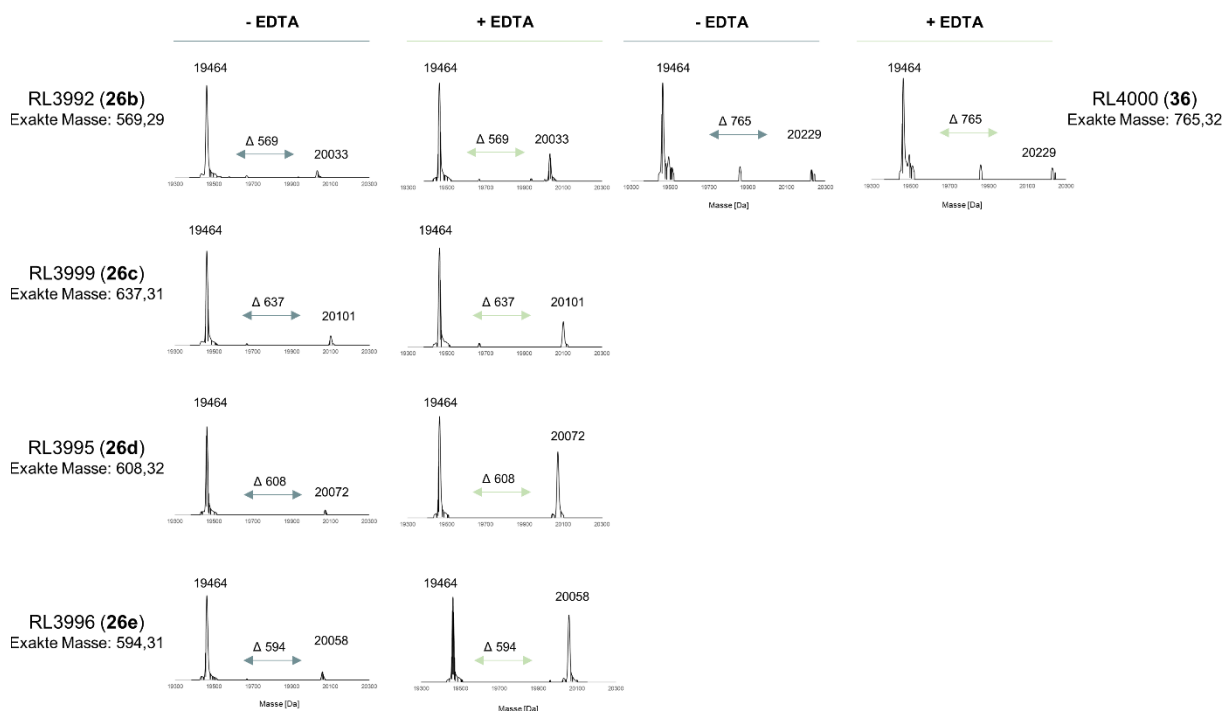


Abbildung 47. MS-basierte Studien bei einem pH Wert von 9,5 der erhaltenen Verbindungen (**26a-e**, **36**) mit KRAS^{G13C}(Cys-light) bei rt mit (grau) und ohne (grün) EDTA.

Abbildung 47 zeigt, dass die Rate der kovalenten Modifikation aller untersuchten Verbindungen bei Zugabe von EDTA zunimmt. Auffällig ist jedoch, dass Verbindungen, die durch einen Linker modifiziert wurden und in Docking-Studien vielversprechende Ergebnisse zeigten, die geringste Rate kovalenter Modifikation aufweisen. Die Analyse der Spektren offenbarte nicht nur Peaks für das unmodifizierte und das modifizierte Protein, sondern auch Peaks, die auf mögliche Spaltprodukte durch Hydrolyse der Verbindungen hinweisen. Dies deutet darauf hin, dass diese Verbindungen, insbesondere bei erhöhtem pH-Wert, eine eingeschränkte Stabilität aufweisen. Hinsichtlich der Effizienz der kovalenten Modifikation erzielte Verbindung **26e** die besten Ergebnisse. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sowohl die Ausrichtung der *warheads* als auch die Länge und Struktur des Linkers in dieser Verbindung besonders optimal gestaltet sind.

GST Pulldown Experiment

Ähnlich wie im vorigen Kapitel beschrieben, wurde für die Verbindung **26c** ebenfalls das GST-Pulldown Experiment durchgeführt. Von Interesse war hierbei ebenfalls, ob unter Zugabe von dem GTP Analogon GppNHp und dem GEF SOS ein Nukleotid-Austausch stattfinden kann und somit eine Interaktion mit der cRaf-RDB stattfindet. Ist dies nicht der Fall, kann dies auf den inhibitorischen Effekt der Verbindung hinweisen.

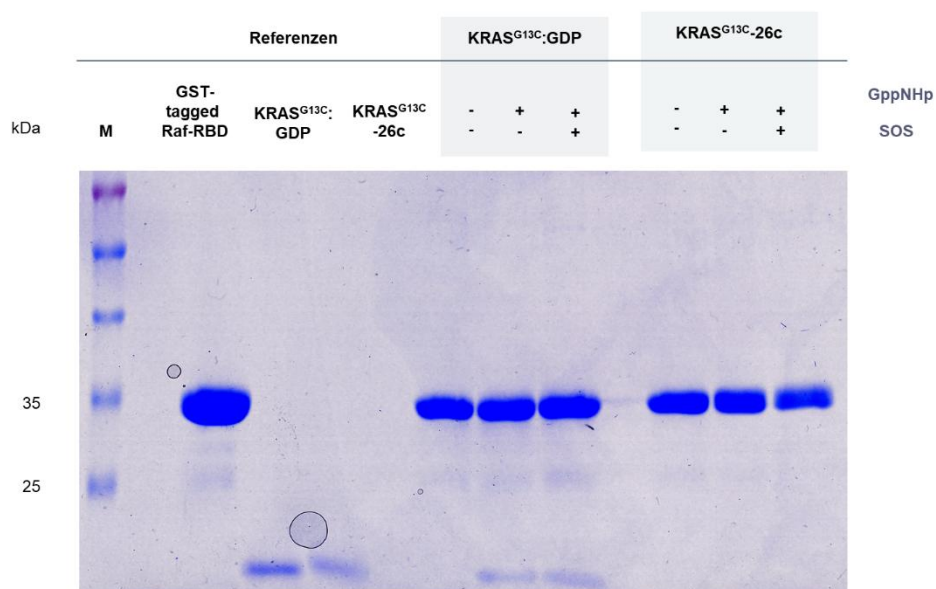


Abbildung 48. Pulldown Experiment. Während KRAS^{G13C}:GDP von die GST-getaggte Raf RBD in Gegenwart von GppNHp und GppNHp/SOS heruntergezogen werden kann, kann mit **26c** modifiziertes KRAS^{G13C} nicht aktiviert werden und folglich nicht an die Raf RBD binden, weder in Gegenwart von GppNHp noch von GppNHp und SOS.

In Abbildung 48 ist ersichtlich, dass im Fall des unmodifizierten KRAS^{G13C}s im GDP-gebundenen Zustand keine zusätzliche Bande zu sehen ist, was darauf hindeutet, dass KRAS sich weiterhin im inaktiven Zustand befindet und nicht mit der RBD interagiert.

Nach Zugabe von GppNHp und zusätzlich SOS kann ein Austausch und somit eine Interaktion stattfinden, wie durch die Bande, die KRAS^{G13C} zugeordnet werden kann, ersichtlich ist. Ist KRAS^{G13C} jedoch irreversibel mit **26c** blockiert, so findet auch bei Zugabe des GEFs SOS kein Nukleotid-Austausch statt, und eine Wechselwirkung mit der RBD kann nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die inhibitorische Wirksamkeit des synthetisierten Liganden.

Zelluläre Studien

Während bei der biochemischen Charakterisierung mit aufgereinigtem und isoliertem Protein gearbeitet wird, stellt sich die Frage der zellulären Potenz. Hierbei ergibt sich ein Bild des inhibitorischen Effekts der Inhibitoren in einem komplexeren System, welches Parameter wie die Zellpermeabilität und das Zusammenspiel anderer Signalwege abbildet. Außerdem können Aussagen über *off-target* Effekte und Zelltoxizität getroffen werden. Für die Untersuchung wurden Zelllinien ausgewählt, welche die Punktmutation KRAS^{G13C} aufweisen. Die Zelllinie H1355 trägt auf einem Allel die genetische Läsion KRAS^{G13C} und auf dem anderen den KRAS^{wt}, sind demnach also heterozygot. Die Zelllinien leiten sich von Tumorgewebe aus der Lunge ab, welches von einem weißen, männlichen und 53-jährigen Patienten entstammt. Zur Evaluierung der Verbindung soll das zuvor bereits beschriebene CTG-Protokoll verwendet werden, welches sich zur Quantifizierung von metabolisch aktiven, lebenden Zellen eignet. In einem ersten Schritt wurde die optimale Zellzahl für diesen Assay bestimmt, um anschließend die erhaltenen EC₅₀-Werte miteinander vergleichen zu können. Dazu wurden die Zellen mit den Inhibitoren, sowie Kontrollverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Nach Auslesen des Lumineszenzsignals konnten dosis-abhängige Kurven erstellt und der EC₅₀-Wert ermittelt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Vergleich der anti-proliferativen Aktivitäten von Referenzverbindungen von KRAS und den neuartigen KRAS^{G13C}-Inhibitoren in der heterozygoten Zelllinie H1355 durch Bestimmung der EC₅₀-Werte.

CTG H1355 (KRAS^{G13C}/wt)		
	Verbindung	EC ₅₀ [μM]
	Adagrasib (MRTX849) (1)	10,19 ± 0,28
	Sotorasib (AMG510) (4)	≥ 30
Referenzen	ARS-1620 (3)	16,55 ± 1,70
	MRTX1133 (2)	12,06 ± 0,66
	RMC-6236 (RAS ^{multi}) (37)	5,07 ± 1,80
	RL3999 (26a)	≥ 30
	RL3992 (26b)	26,83 ± 0,53
	RL3994 (26c)	29,12 ± 1,55
KRAS ^{G13C} Inhibitoren	RL3995 (26d)	≥ 30
	RL3996 (26e)	25,31 ± 1,51
	RL4000 (36)	≥ 30

Die untersuchten Referenzverbindungen, die für die Mutationen KRAS^{G12C} und KRAS^{G12D} entwickelt wurden, zeigen eine geringe zelluläre Potenz im niedrigen mikromolaren Bereich. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Verbindungen möglicherweise reversibel an die KRAS^{G13C}-Mutante binden und somit eine Inhibition des Proteins bewirken.

Unter den getesteten Substanzen weist die Referenzverbindung RMC-6236, ein Multi-RAS-Inhibitor, eine signifikant verbesserte Potenz auf, die etwa das Zweifache im Vergleich zu den anderen Referenzverbindungen beträgt. Trotz dieser verbesserten Wirksamkeit deutet die insgesamt vergleichsweise geringe Potenz auf eine moderate bis unzureichende Sensitivität der getesteten Zelllinie hin, was möglicherweise auf die Heterozygotie des KRAS-Gens zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigen die in dieser Arbeit neu generierten potenziellen KRAS^{G13C}-Inhibitoren keine signifikante zelluläre Aktivität und weisen zelluläre Potenzen auf, die sich am unteren Rand des Assay-Fensters befinden. Diese Ergebnisse könnten auf eine unvollständige Optimierung der Verbindungen hindeuten. Zudem scheint die humane Lungenkrebszelllinie H1355 aufgrund ihrer geringen Sensitivität als Evaluationssystem für die Inhibitoren ungeeignet zu sein. Des Weiteren wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die Moleküle eine verminderte Löslichkeit oder Permeabilität aufweisen, was die zellulären Tests zusätzlich erschweren könnte. Zur Überprüfung der allgemeinen Zelltoxizität der Verbindungen sollten Tests an Zelllinien durchgeführt werden, die keine Läsionen oder Abhängigkeiten im RAS-Signalweg aufweisen.

Um zu untersuchen, ob die mangelnde Eignung des CTG-Assays zur Bewertung der zellulären Potenz der Verbindungen auf Zelllinien, die nicht von KRAS^{G13C} abhängig sind, zurückzuführen ist, wurden ergänzend Western-Blot-Analysen durchgeführt. Diese dienen dazu, pharmakodynamische Veränderungen zu erfassen, indem die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine im KRAS-Signalweg untersucht wurde. Auf diese Weise können potenzielle Effekte der Verbindungen auf die Signaltransduktion genauer bewertet werden.

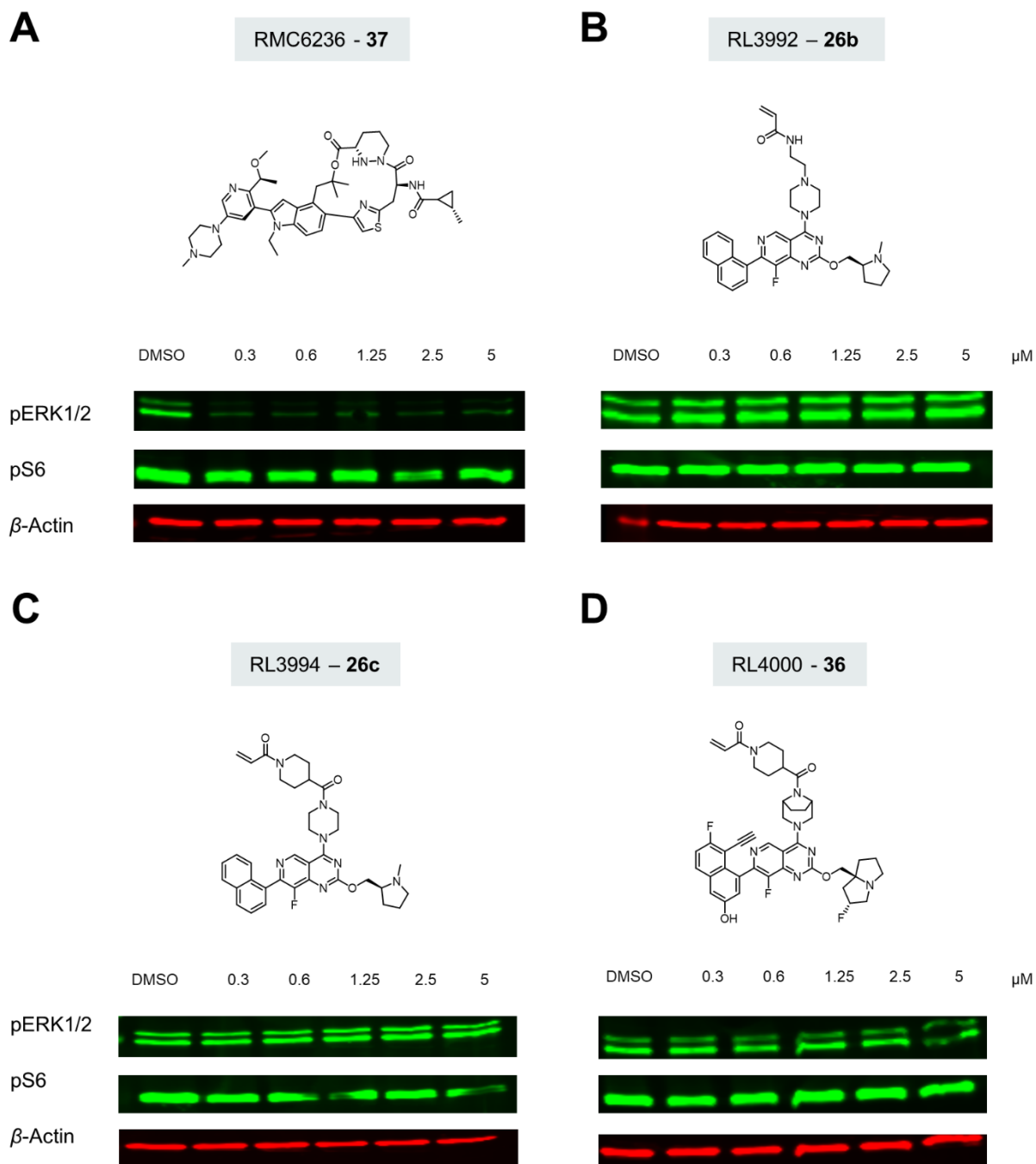


Abbildung 49. Western Blots der Zelllinie H1355 nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen (0-5 μM) von Verbindung **37** (A), **26b** (B), **26c** (C), **36** (D) für 24 h. Im Anschluss wurde der Phosphorylierungszustand der Kinasen ERK1/2 sowie S6 (grün) untersucht. β-Actin diente als interne Beladungskontrolle (rot). Die Western-Blots wurden in Zusammenarbeit mit Vincent Wagner angefertigt.

Es zeigte sich, dass für die Verbindungen RL3992 (**26b**) und RL3994 (**26c**) keine Reduktion der Phosphorylierung der Proteinkinase ERK1/2 sowie der ribosomalen Kinase S6 zeigten. Dennoch konnte für die optimierte Verbindung RL4000 (**36**) eine leichte Reduktion des pERK1/2-Signals detektiert werden.

Für den multi-RAS-Inhibitor RMC-6236 (**37**) konnte hingegen bereits bei einer geringen Konzentration (0.3 μM) dosis-abhängig eine signifikante Reduktion des pERK1/2-Signals beobachtet werden. Dies spricht für eine Inhibitor-vermittelte Hemmung des RAS-Signalwegs durch die Verbindung **37** (Abbildung 49).

Aufgrund der Erkenntnis, dass die Zelllinie H1355, die die KRAS^{G13C}-Mutation nur auf einem Allel trägt, für die Evaluierung der neuartigen Verbindungen nur bedingt geeignet zu sein scheint, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bauer am Universitätsklinikum Essen eine neue Zelllinie entwickelt. Diese basiert auf T1-Zellen und wurde mittels CRISPR/Cas9-System so modifiziert, dass sie homozygot die KRAS^{G13C}-Mutation trägt. Diese Zelllinie soll ein besseres Modell zur Untersuchung der potenziellen Inhibitoren darstellen.¹⁴ Die T1-Zelllinie zeichnet sich durch eine Deletion im Exon 11 des Rezeptortyrosinkinase-Gens KIT aus, welche eine primäre aktivierende Mutation darstellt. Diese Zellen sind stark abhängig vom Onkogen KIT und sprechen gut auf Inhibitionen von KIT an. Nach der Einführung des KRAS^{G13C}-Onkogens wurde die neu generierte T1-KRAS^{G13C}-Zelllinie im Vergleich zu den parentalen T1-Zellen auf KIT-Inhibitoren getestet. Dabei zeigte sich, dass nach der Einführung von KRAS^{G13C} eine deutlich reduzierte Ansprechrate auf die KIT-Inhibitoren im Vergleich zu den parentalen T1-Zellen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen zunehmend von diesem Onkogen abhängig werden. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die T1-KRAS^{G13C}-Zelllinie gut geeignet, um in weiteren Studien die Wirksamkeit neuartiger Inhibitoren zu evaluieren. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der Sulforhodamin-B-Assay (SRB-Assay) eingesetzt, bei dem der Gesamtproteingehalt der Zellen photometrisch mittels eines Farbstoffs gemessen wird. Die T1-KRAS^{G13C}-Zellen wurden ausgesät und mit den jeweiligen Verbindungen in einer Verdünnungsreihe über 72 Stunden inkubiert.

¹⁴ Die nachfolgenden Ergebnisse wurden von Yanosan Thavarasa und Dr. Thomas Mühlenberg (AG Bauer, Universitätsklinikum Essen) generiert.

Tabelle 2. Vergleich der anti-proliferativen Aktivitäten von Referenzverbindungen von KRAS und den neuartigen KRAS^{G13C}-Inhibitoren in der homozygoten GIST Zelllinie GIST-T1-KRAS^{G13C} durch Bestimmung der GR₅₀-Werte. Die Daten wurden von Yanosan Thavarasa und Dr. Thomas Mühlenberg (AG Bauer, Universitätsklinikum Essen) erhoben.

SBR GIST-T1			
	Verbindung	GIST-T1 GR ₅₀ [µM]	GIST T1-KRAS ^{G13C} GR ₅₀ [µM]
Referenzen	Sotorasib (AMG510) (4)	> 10	> 10
	MRTX1133 (2)	> 10	0,4
	RMC-6236 (RAS ^{multi}) (37)	0,8	0,001
KRAS ^{G13C} Inhibitoren	RL3992 (26b)	> 10	> 10
	RL3994 (26c)	> 10	> 10
	RL3995 (26d)	5,9	> 10
	RL3996 (26e)	> 10	> 10
	RL4000 (36)	> 10	1,4

In Tabelle 2 ist ersichtlich, dass die Verbindungen **26a-e** keinen erkennbaren zellulären Effekt auf die neu generierten T1-KRAS^{G13C}-Zellen zeigten. Auch die Referenzverbindung Sotorasib (**4**) zeigte keinen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte für den Multi-RAS-Inhibitor RMC-6236 ein GR₅₀-Wert von 1 nM ermittelt werden. Interessanterweise wies die optimierte Verbindung RL4000 (**36**), die von MRTX1133 (**2**) abgeleitet wurde, einen GR₅₀-Wert von 1,4 µM auf. Im Vergleich zur parentalen T1-Zelllinie, die als Kontrolle diente und keinerlei Aktivität zeigte, deutet dies darauf hin, dass die Verbindung RL4000 (**36**) eine gewisse Selektivität gegenüber den KRAS^{G13C}-modifizierten Zellen aufweist.

Um detailliertere Einblicke in das pharmakodynamische Verhalten der Verbindungen zu gewinnen, sollten ergänzend Western-Blot-Analysen durchgeführt werden.

Zum besseren zellulären Verständnis wäre es zusätzlich von Vorteil die zelluläre Potenz von den neuartigen Inhibitoren mittels des Ba/F3 Zellsystems zu überprüfen. Hierbei werden Zellen, welche von Interleukin abhängig sind, mit einem Virus infiziert, welche das gewünschte Onkogen - KRAS^{G13C} - enthalten und die Zellen langsam von Interleukin entwöhnt. Dadurch entwickelt sich im optimalen Fall eine *oncogene addiction* zu KRAS^{G13C}. Zum einen könnten die onkogenen, zellulären Prozesse dieser Mutante in einem artifiziellen System untersucht werden und zum anderen auch das Verhalten der Inhibitoren innerhalb der Zelle.¹³⁹

Die vorliegenden Daten belegen, dass die hier entwickelten Verbindungen einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung von KRAS^{G13C}-Inhibitoren darstellen, jedoch weiteres Optimierungspotenzial aufweisen. Neben der Erhöhung der Affinität und Potenz der Verbindungen sollte ein besonderes Augenmerk auf die Verbesserung von Löslichkeit und Zellgängigkeit gelegt werden, da eine eingeschränkte Potenz möglicherweise auf unzureichende physikochemische Eigenschaften wie geringe Löslichkeit oder Zellpermeabilität zurückzuführen ist. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass KRAS^{G13C}-mutierte Varianten durch eine erhöhte Nukleotidaustauschrate sowie eine verringerte Affinität zu Nukleotiden charakterisiert sind. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, ein Konzept zu entwickeln, das gezielt den GTP-gebundenen aktiven Zustand adressiert, um die inhibitorische Wirksamkeit der Verbindungen weiter zu steigern.^{131, 140}

Proteinkristallisation

Die zellulären Studien haben gezeigt, dass die neu generierten Substanzen noch erhebliches Potenzial zur Verbesserung aufweisen. Daher ist es notwendig, strukturbasierte Ansätze zu verfolgen, um die Moleküle weiter zu optimieren. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Kapiteln wird angestrebt, KRAS^{G13C} in Kombination mit den neuen Inhibitoren zu ko-kristallisieren.¹⁵ Zu diesem Zweck wurde KRAS^{G13C} über Nacht bei rt in einem pH-Bereich von 9,5 und in einem zehnfachen molaren Überschuss mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Inhibitor und Protein wurde mittels MS überwacht. Im Anschluss daran wurde der entstandene Komplex durch eine SEC aufgereinigt, um sowohl eine homogene Lösung zu erhalten als auch einen Pufferwechsel auf einen pH-Wert von 7,5 durchzuführen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde auf 40-60 mg/ml eingestellt. Daraufhin wurden in kommerziell erhältlichen *Screening*-Verfahren eine Vielzahl von Kristallisationsbedingungen bei 20 °C getestet. Hierbei konnten einige vielversprechende Bedingungen identifiziert werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass nur sehr kleine Kristalle während der Screens erhalten wurden. Daher wurde im nächsten Schritt versucht, die Bedingungen sowie das Kristallwachstum in spezifischen *Fine-Screenings* zu reproduzieren. Unter den gegebenen Bedingungen (200 mM CaCl₂, 200 mM NaAc pH 4,6, 20 % Isopropanol) konnte ein Kristall unter einer Proteinhaut identifiziert werden. Dennoch ergab sich bei der Analyse am ESRF lediglich eine Diffraktion von 3 Å, was darauf hinweist, dass die Bedingungen weiter optimiert werden müssen (Abbildung 50).

¹⁵ Die nachfolgenden Ko-Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Janina Niggenaber und M.Sc. Jan-Niklas Wiese durchgeführt. Die Proteinexpression, der hier verwendeten Konstrukte, wurde von Andreas Arndt durchgeführt.

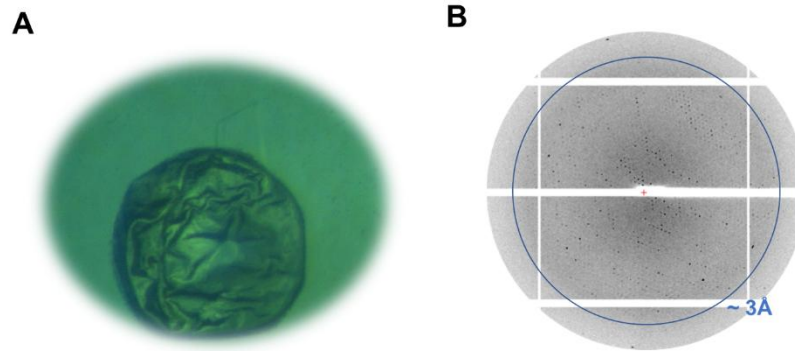


Abbildung 50. A: Gefundener Kristall unter einer Proteinhaut im kommerziellen Screen H2, JCSG Core II (200 mM CaCl_2 , 200 mM NaAc pH 4,6, 20 % Isopropanol). **B:** Diffraktionsbild vom Kristall aus **A**. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit M.Sc. Jan Niklas Wiese generiert.

Um das Kristallwachstum zu verbessern, wurde ein *Additiv-Screening* (Additive Screen HT, Silver Bullets, Hampton Research) eingesetzt. In diesem *Screening* wurden kommerziell erhältliche Lösungen zu den initialen Kristallisationsbedingungen (200 mM CaCl_2 , 200 mM NaAc pH 4,6, 20 % Isopropanol) hinzugefügt, um das Kristallwachstum positiv zu beeinflussen. Unter vier dieser Bedingungen (+ 0,1 M Ammoniumsulfat, + 3 % Dextransulfat-Natriumsalz, + 0,1 M Natrium-Malonat pH 7.0, + 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) konnte kristallines Wachstum beobachtet werden, jedoch wurde am ESRF festgestellt, dass es sich um Salz-Kristalle handelte bzw. keine Diffraction für die erhaltenen Kristalle detektiert werden konnte (Abbildung 51).

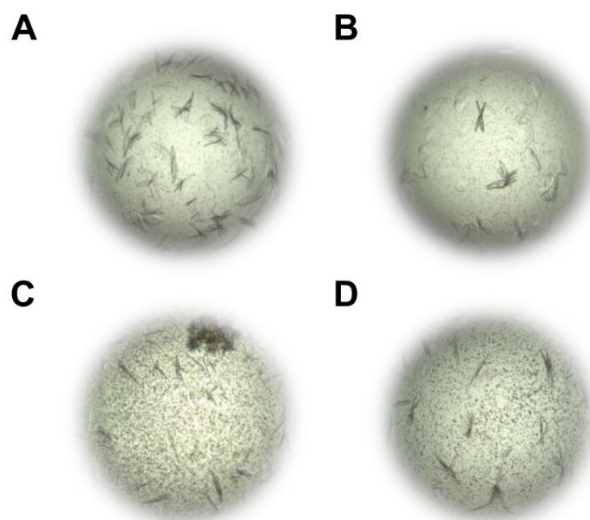


Abbildung 51. Ergebnisse des Additiv-Screenings mit den Ursprungsbedingungen 200 mM CaCl₂, 200 mM NaAc pH 4,6, 20 % Isopropanol bei 20 °C. **A:** + 0,1 M Ammoniumsulfat. **B:** + 3 % Dextransulfat-Natriumsalz. **C:** + 0,1 M Natrium-Malonat pH 7.0. **D:** + 0,1 M (NH₄)₂SO₄. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Janina Niggenaber generiert.

In den initialen Versuchen wurde kein Erfolg erzielt, qualitativ hochwertige Kristalle zu identifizieren. Eine mögliche Fehlerquelle wurde in der unvollständigen kovalenten Modifikation des Proteins mit dem Inhibitor gesehen. Dies deutet darauf hin, dass die Kristallisationslösung nicht homogen ist, was sich negativ auf die Kristallisation auswirken könnte. Um die kovalente Modifikation zu erhöhen, wurde die Verbindung portionsweise (je fünf Äquivalente) über vier Tage hinzugefügt und bei rt und pH 9,5 inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung erneut durch SEC aufgereinigt, um überschüssiges DMSO zu entfernen. Dennoch blieben diese Bemühungen ohne den gewünschten Erfolg, was die Suche nach alternativen Herangehensweisen notwendig machte. Zu diesem Zweck wurde anstelle von KRAS^{G13C} die HRAS^{G13C} Variante in der *Cys-light* Form verwendet, da bekannt ist, dass HRAS eine höhere Kristallisationsneigung aufweist und in vergangenen Studien als Modellsystem diente. HRAS weist im Vergleich zu KRAS eine Sequenzidentität von 94 % auf. Zudem wurden dem Modifikationspuffer EDTA und das nicht-Thiolhaltige Reduktionsmittel TCEP hinzugefügt. Das EDTA dient der Komplexbildung von Mg²⁺-Ionen, was die Bindung von GDP schwächt und somit zur Destabilisierung des Proteins führt. Dies könnte dazu führen, dass die kovalente Bindung erleichtert wird, da die negativ-geladenen Phosphatgruppen das Bindungsereignis nicht mehr erschweren.

Der Vorgang wird durch die Zugabe von $MgCl_2$ am Ende der kovalenten Modifikation abgeschlossen. TCEP wird in einer Konzentration von 5 mM hinzugefügt, da in früheren Tests festgestellt wurde, dass sich Dimere des Proteins bildeten. Das Protein wurde erneut im fünf-fachen Überschuss mit den Verbindungen **26b**, **26c** und **36** inkubiert, wobei das Molekül portionsweise über einen Zeitraum von drei bis vier Tagen hinzugefügt wurde. Da während dieser Testungen aufgefallen ist, dass nach der Zugabe der Verbindungen eine Präzipitatbildung stattfand, konnte im Anschluss keine Aufkonzentrierung nach der SEC der Proteinlösung stattfinden. Aus diesem Grund wurde das unmodifizierte Protein in einem Bereich von 22 - 85 mg/ml aufkonzentriert und anschließend die Verbindung in einem 1,5-fachen Überschuss direkt in die Proteinlösung gegeben und für die Kristallisation verwendet. Hierbei wurde erneut in kommerziellen Screenings getestet Innerhalb der kommerziellen Screenings konnten für die Verbindung **36** einige vielversprechende Bedingungen identifiziert und kristallines Wachstum beobachtet werden (Abbildung 52).

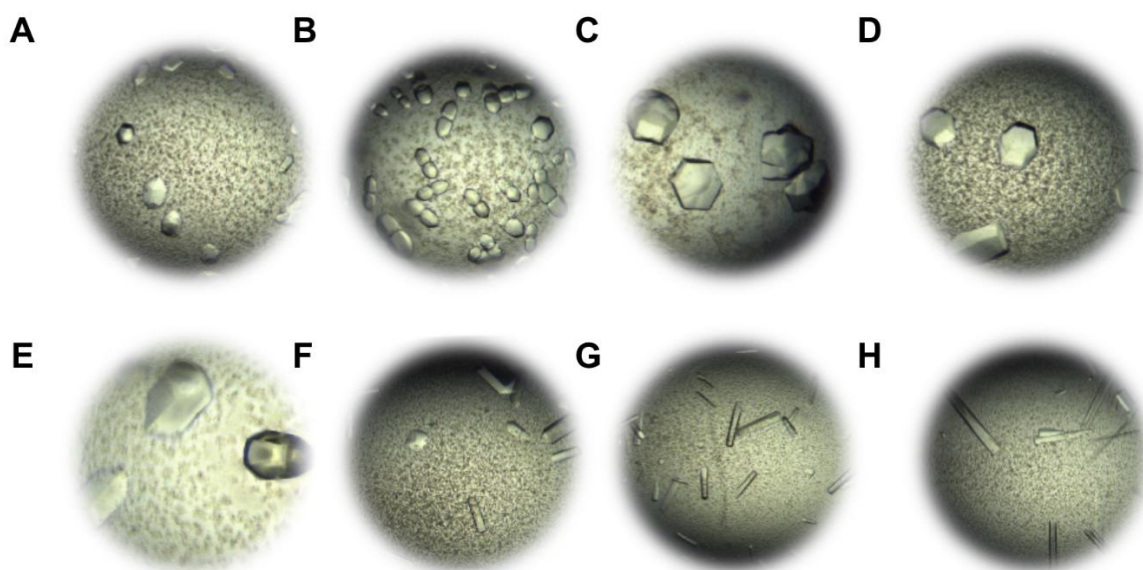


Abbildung 52. Beispielhafte Abbildungen von kristallinem Wachstum in den kommerziellen Screenings von HRAS^{G13C} und der Verbindung **36** bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 51 und 85 mg/ml. **A:** Core I; B9 (85.4 mg/ml, 200 mM K-Formiat, 20 % PEG3350). **B:** Core I; E6 (85.4 mg/ml, 100 mM MES pH 6.0, 5 % PEG3000, 5 % MP). **C:** Core I; F3 (85.4 mg/ml, 200 mM Mg-Formiat, 20 % PEG3350). **D:** Core III; C6 (85.4 mg/mL, 100 mM HEPES pH 7.5, 28 % PEG400, 200 mM $CaCl_2$). **E:** PACT; A3 (85.4 mg/ml, 25 % PEG1500, 100 mM SPG pH 6.0). **F:** PACT; B9 (85.4 mg/mL, 200 mM LiCl, 100 mM MES pH 6.0, 20 % PEG6000). **G:** PEG I; C9 (85.4 mg/ml, 100 mM MES pH 6.0, 25 % PEG6000). **H:** PEG I; C10 (85.4 mg/mL, 100 mM MES pH 6.0, 25 % PEG8000). Die Ergebnisse wurden von Dr. Janina Niggenaber generiert.

Aus diesen Experimenten konnte für den Proteinkristall aus der Bedingung erfolgreich ein Datensatz am ESRF mit einer Auflösung von 2,5 Å und der Raumgruppe P 6₃ aufgenommen werden. Hierbei fiel dennoch auf, dass zwei Ketten aus der asymmetrischen Einheit so zueinander ausgerichtet sind, dass die beiden Cys13 eine Disulfid-Brücke ausbilden könnten. Außerdem konnte keine Dichte, die der Verbindung **36** zuzuordnen ist, detektiert werden. Aus diesem Grund wurden erneut *Fine-Screenings* angesetzt, wobei mehr TCEP (5 mM) im Puffer verwendet wurde, um die Entstehung der Dimere zu verhindern. Dazu wurde das Protein auf 76 mg/ml aufkonzentriert und mit dem Inhibitor **36** im fünf-fachen Überschuss versetzt und direkt zur Kristallisation eingesetzt. Die Bedingungen der *Fine-Screenings* stammen dabei aus den Bedingungen, welche in dem kommerziellen *Screening* als vielversprechend identifiziert wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3. Bedingungen der *Fine-Screenings* basierend auf den gefundenen Bedingungen von HRAS^{G13C} durchgeführt bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 76 mg/ml. Die Experimente wurden von Dr. Janina Niggenaber durchgeführt.

Eintrag	Basierend auf	Bedingung
1	Core 1; A12	17,5-27,5 % PEG3350 200 mM MgAc ₂
2	Core 1; B9	17,5-27,5 % PEG3350 200 mM K-Formiat
3	Core 1; F3	17,5-27,5 % PEG3350 200 mM Mg-Formiat
4	Core 3; C6	24-32 % PEG 400 100 mM HEPES pH 7.5 200 mM CaCl ₂
5	Core 3; E5	13,3-17,7 % PEG8000 20 % Glycerol 80 mM Na-Cacodylate pH 6.4 160 mM CaAc ₂
6	PACT; B9	17,5-27,5 % PEG6000 100 mM MES pH 6 200 mM LiCl

Innerhalb der *Fine-Screenings* konnte erneut kristallines Wachstum beobachtet werden (Abbildung 53). Die Kristalle wurden daraufhin zum ESRF gesandt und dort auf Protein-Diffraktion hin untersucht. Hierbei konnte erneut ein Datensatz aufgenommen (1,8 Å) werden, welcher ebenfalls keine Elektronendichte enthielt, die der Verbindung **36** zugeordnet werden konnte

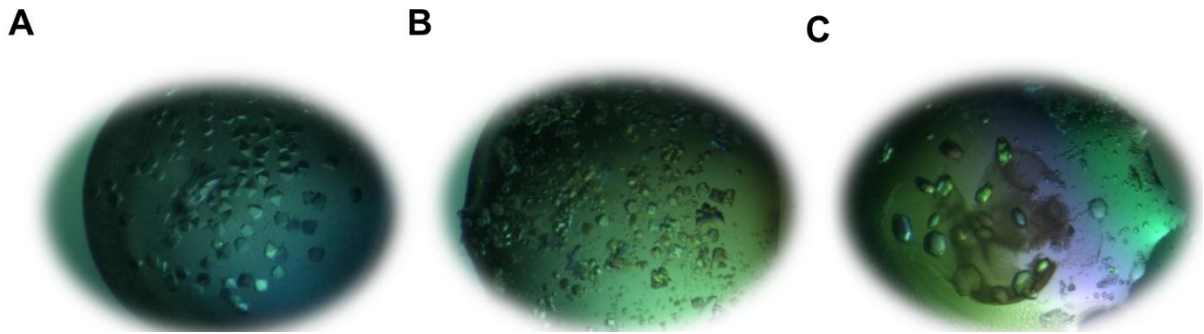


Abbildung 53. Ergebnisse der *Fine-Screenings* von HRAS^{G13C} inkubiert mit Verbindung **36** im fünf-fachen Überschuss bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 76 mg/ml. **A:** 17,5 % PEG3350, 200 mM MgAc₂. **B:** 25 % PEG3350, 200 mM Mg-Formiat. **C:** 25 % PEG3350, 200 mM Mg-Formiat. Die Ergebnisse wurden von Dr. Janina Niggenaber generiert.

Diese Struktur wurde für eine Strukturanalyse genutzt, da es keine in der PDB verfügbare KRAS bzw. HRAS^{G13C}-Struktur gibt.

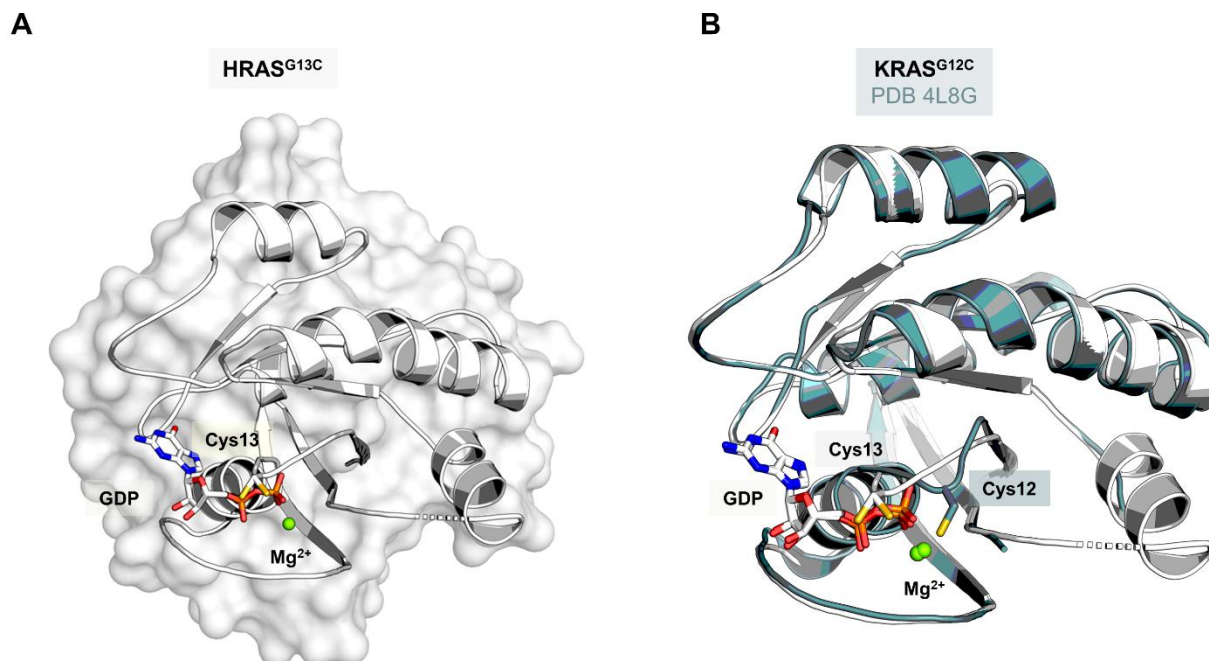


Abbildung 54.A: Kristallstruktur von HRAS^{G13C}₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) im GDP-gebundenen Zustand. Das mutierte Cys13 liegt in zwei verschiedenen Konformationen vor. Kristallisationsbedingungen: 20 % PEG3350, 200 mM Mg-Formiat. Proteinkonzentration: 75,6 mg/ml. **B:** Überlagerung von der hier erhaltenen HRAS-Struktur im Vergleich zur Literatur-beschriebenen KRAS^{G12C}-Struktur (blau, PDB 4L8G). Die Kristallstruktur von HRAS^{G13C} wurde von Dr. Janina Niggenaber gelöst.

In Abbildung 54 zeigt sich, dass GDP in der Nukleotidbindetasche von HRAS^{G13C} gebunden ist, wobei es sowohl mit Aminosäureseitenketten der Tasche als auch mit dem Magnesiumion interagiert. Das mutierte Cys13 konnte in zwei verschiedenen Konformationen modelliert werden, was auf eine Flexibilität der Seitenkette hindeutet. Diese Flexibilität könnte für das zukünftige Design von Inhibitoren von Bedeutung sein. Im direkten Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen Struktur des KRAS^{G12C}-Proteins ist erkennbar, dass beide Proteine in der GDP-gebundenen Form vorliegen und alle Strukturelemente in derselben Konformation angeordnet sind. In der hier dargestellten Struktur konnte zudem eine Helix der *Switch-II*-Region aufgelöst werden, die in der KRAS^{G12C}-Struktur nicht sichtbar ist. Dieser Vergleich verdeutlicht auch, dass das Cys13 in der hier untersuchten Struktur näher an der Nukleotidbindetasche liegt und weiter von der SWIIP-Tasche entfernt ist, was bei der Entwicklung von Inhibitoren berücksichtigt werden sollte.

In der gleichen Herangehensweise sollte der reversible Inhibitor MRTX1133 (**2**) mit HRAS^{G13C} ko-kristallisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Protein in einem EDTA-freien Puffer bei einem pH-Wert von 8,5 unter Zugabe von 2 mM TCEP auf eine Konzentration von 22 mg/ml aufkonzentriert. Anschließend wurde das Protein mit 1,5 Äquivalenten des Inhibitors versetzt. Die Kristallisation erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C über einen Zeitraum von etwa einem Monat. Die daraus resultierenden Proteinkristalle ermöglichten die Erhebung eines Datensatzes mit einer exzellenten Auflösung von 1,8 Å.

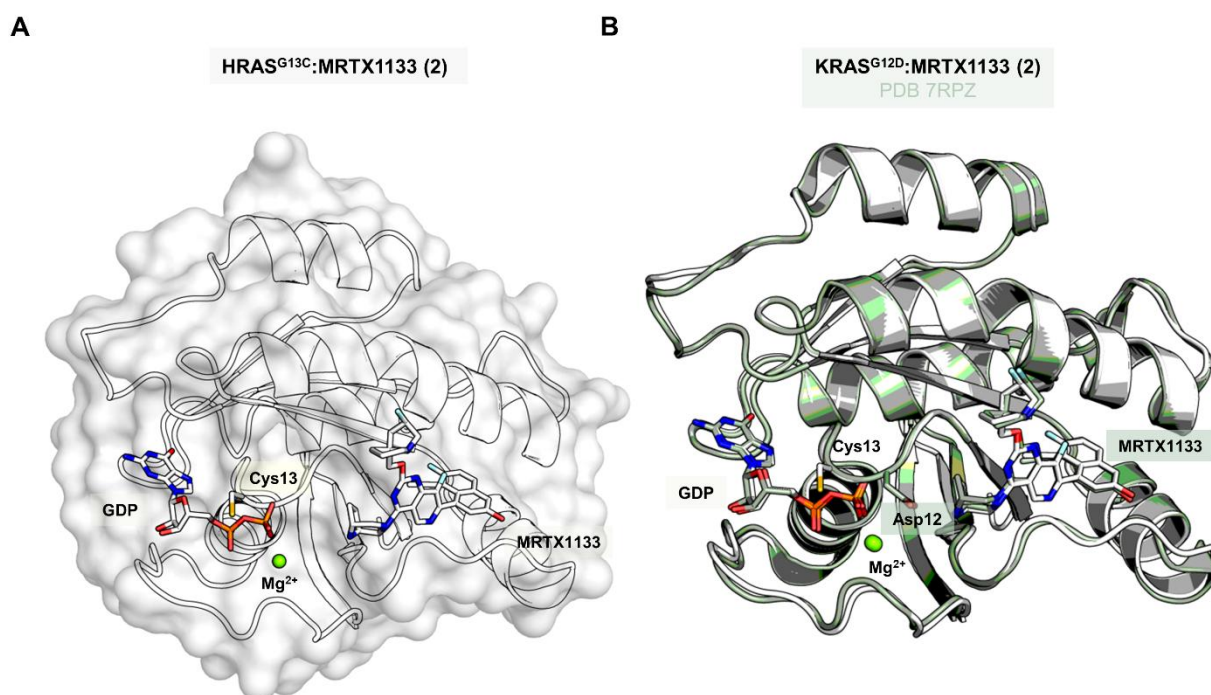


Abbildung 55. A: Kristallstruktur von HRAS^{G13C}₁₋₁₆₉ (Cys-light) im GDP-gebundenen Zustand und der reversibel gebundene Inhibitor MRTX1122 (**2**). Kristallisationsbedingungen: 27,5 % PEG3350, 200 mM KAc. Proteinkonzentration: 22 mg/ml. **B:** Überlagerung von der hier erhaltenen HRAS-Struktur im Vergleich zur Literatur-beschriebenen KRAS^{G12D}-Struktur (grün, PDB 7RPZ). Die Kristallstruktur von HRAS^{G13C} wurde von Dr. Janina Niggenaber gelöst.

In Abbildung 55 wird ersichtlich, dass GDP in der Nukleotidbindetasche von HRAS^{G13C} gebunden ist. Dabei zeigt sich eine typische Interaktion des GDP mit den Seitenketten der Aminosäuren in der Nukleotidbindetasche sowie mit dem in der Struktur ebenfalls vorhandenen Mg²⁺-Ion. Das mutierte Cystein an Position 13 konnte ebenfalls in der Struktur eindeutig aufgelöst werden. Der Inhibitor MRTX1133 (**2**) liegt reversibel gebunden in der ausgebildeten *Switch-II-Pocket* vor.

Ein Vergleich der hier ermittelten HRAS^{G13C}:MRTX1133-Struktur mit der in der Literatur beschriebenen KRAS^{G12D}:MRTX1133-Struktur (PDB 7RPZ) zeigt eine Übereinstimmung in der Bindungsweise des Inhibitors. In beiden Fällen ist MRTX1133 (**2**) reversibel in der SWIIP lokalisiert. Darüber hinaus zeigt die KRAS^{G12D}:MRTX1133-Struktur, dass der Inhibitor dort zusätzlich über eine Salzbrücke mit dem mutierten Asp12 interagiert.

Diese Kristallstruktur kann für das Design neuer Inhibitoren und insbesondere für die Auswahl neuer Linkermotive dienen.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Teilprojekts konnte erstmals demonstriert werden, dass die KRAS^{G13C}-Mutante kovalent über die allosterische SWIIP adressiert werden kann. Auf Basis des MRTX1133-Moleküls (**2**) wurden neuartige Inhibitoren entwickelt, die über ein Linkermotiv das Cys13 kovalent modifizieren. Diese Verbindungen wurden umfassend durch *Docking*-Studien untersucht und validiert. Darüber hinaus wurde eine robuste Syntheseroute etabliert, basierend auf modifizierten, literaturbekannten Methoden. Diese ermöglicht nicht nur die Darstellung der neuartigen Verbindungen, sondern bietet auch Optionen für die Derivatisierung. Massenspektrometrische Studien belegten die kovalente Bindung der Inhibitoren an die KRAS^{G13C}-Mutante. In einem GST-Pulldown-Assay wurde gezeigt, dass das Protein nach kovalenter Modifikation nicht mehr durch SOS aktiviert werden konnte und keine Interaktion mit dem Effektor Raf-RBD einging, was auf einen inhibitorischen Effekt der Verbindungen hinweist. Da in zellbasierten Assays mit KRAS^{G13C}-mutierten Krebszelllinien zunächst keine signifikante Aktivität festgestellt wurde, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bauer und unter Anleitung von Dr. Thomas Mühlenberg homozygote KRAS^{G13C}-Mutanten-Zelllinien generiert. Diese Zelllinien dienten als Grundlage für zelluläre SBR-Assays. Erstmals konnte dabei eine zelluläre Wirksamkeit des Modulators **36** nachgewiesen werden. Diese Zellen sollten zukünftig für weiterführende Western-Blot-Studien zur Evaluierung der Verbindungen genutzt werden. In initialen Ko-Kristallisationsstudien wurden

vielversprechende Bedingungen identifiziert, jedoch konnten bislang weder Datensätze noch Elektronendichten aus den Kristallen gewonnen werden.

Strukturelle Erkenntnisse wären jedoch essenziell, um das Design einer zweiten Generation optimierter Moleküle gezielt voranzutreiben. Für diese Optimierung könnten die bereits identifizierten Derivatisierungsstellen an den Positionen 7' und 2' genutzt werden, um die Potenz, Löslichkeit und Zellgängigkeit der Moleküle zu verbessern. Dies ist besonders relevant, da eingeschränkte Zellgängigkeit und Löslichkeit möglicherweise die begrenzte zelluläre Potenz der Verbindungen erklären. Zudem könnte es vorteilhaft sein, Moleküle zu entwickeln, die auch an die GTP-gebundene Form der KRAS^{G13C}-Mutante binden, da angenommen wird, dass diese bevorzugt im aktiven Zustand vorliegt. Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten könnte auf der Entwicklung reaktiverer *warheads* liegen, um die mutmaßlich geringere Reaktivität von Cys13 im Vergleich zu Cys12 zu überwinden, was möglicherweise auf die Nähe zu negativ geladenen Phosphatgruppen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend liefert dieses Projekt grundlegende Erkenntnisse zur bislang wenig erforschten KRAS^{G13C}-Mutante, die als Grundlage für zukünftige Studien dienen können. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die allosterische Tasche dieser Mutation durch niedermolekulare, „*drug-like*“ Verbindungen adressiert werden kann. Künftige Forschung sollte sich auf die Entwicklung hochaffiner und selektiver Sondenmoleküle konzentrieren, um die biologischen Eigenschaften dieser Mutation detailliert zu untersuchen und darauf aufbauend KRAS^{G13C}-spezifische Therapeutika zu entwickeln.

Evaluierung von Sonden-Molekülen für die Proteinkinase AKT2¹⁶

Einleitung

Ähnlich wie die kleine GTPase KRAS stellt die Proteinkinase B – auch AKT genannt – einen wichtigen Knotenpunkt im zellulären Geschehen dar. Proteinkinasen, welche sich aufgrund ihrer Substrate in Tyrosin-, Serin- und Threonin-Kinasen unterscheiden, vermitteln ihre Signalweiterleitung durch die Phosphorylierung von Aminosäuren nachgeschalteter Proteine.^{141, 142} Dabei wird eine endständige γ -Phosphatgruppe auf Substrate übertragen und diese somit phosphoryliert.¹⁴³ AKT ist im PI3K-AKT-mTOR-Signalweg involviert und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose. Aktivierende Mutationen in der PI3K-Kinase oder auch die Amplifikation von AKT selbst können zu einer Überaktivierung des Signalwegs führen, was das Zellschicksal beeinflusst und verschiedene Krebsarten hervorrufen kann.¹⁴⁴ Aus diesem Grund stellt AKT eine attraktive Zielstruktur in der Präzisionsmedizin dar.¹⁴⁵

Im Jahr 2023 wurde der erste ATP-kompetitive AKT-Inhibitor Capivasertib von der FDA zugelassen.^{146, 147} Obwohl es eine Vielzahl von AKT-Inhibitoren gibt, gelang es lange Zeit nicht, die gezielte Adressierung von AKT in klinische Erfolge zu übersetzen, und viele klinische Studien scheiterten. Ein Grund hierfür könnte die Existenz der drei Isoformen von AKT (AKT1, AKT2 und AKT3)¹⁴⁸⁻¹⁵¹ und deren unspezifische Adressierung durch die Inhibitoren sein, was zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann. Deren unterschiedliche Funktion mag unter anderem an der zellulären Lokalisation als auch verschiedenen Expressionslevel in Geweben begründet liegen.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Aus diesem Grund stellt die Generierung von Isoform-spezifischen Molekülen eine große Chance dar, um die zelluläre Rolle der einzelnen Isoformen besser zu verstehen und den klinischen Erfolg wahrscheinlicher zu machen.

¹⁶ Die in diesem Abschnitt verwendeten Sonden wurden von Dr. Lena Quambusch im Rahmen ihrer Dissertation angefertigt. Die Ergebnisse beruhen auf ihren Vorarbeiten.

Besonders erfolgreich haben sich sogenannte Interdomänen-Inhibitoren erwiesen, die in eine Tasche innerhalb von AKT binden, welche von der Kinase-Domäne und der regulatorischen *Pleckstrin-Homologie* (PH)-Domäne gebildet wird. Dies ist im Fall von AKT einzigartig und ermöglicht eine hervorragende Selektivität innerhalb des Kinoms.^{155, 156} Beispiele hierfür sind die Moleküle Miransertib oder Akti-1/2.^{157, 158} Dieses Konzept wurde von der Arbeitsgruppe Rauh weiterentwickelt und um einen kovalenten Ansatz ergänzt. Dabei wurde am östlichen Molekülteil ein MICHAEL-Akzeptor eingeführt, was zum ersten kovalenten allosterischen AKT-Inhibitor (engl. *covalent allosteric AKT inhibitor*, (CAAI)) Borussertib führte.^{146, 159} Basierend auf der Dissertation von Dr. Lena Quambusch wurde das Prinzip der kovalent allosterischen Adressierung von AKT weiterentwickelt und ein Molekül mittels strukturgestütztem Wirkstoffdesign generiert, das spezifisch die Isoform AKT2 adressieren kann. Um dieses Molekül weiter zu funktionalisieren, wurde es mit einer Alkin-Gruppe modifiziert, sodass die Isoform-spezifischen Interaktionen erhalten bleiben konnten (Abbildung 56).^{139, 160} In der Vergangenheit wurden zwar schon einige Fragen hinsichtlich der zellulären Lokalisation sowie der gewebespezifischen Expression der drei AKT-Isoformen beantwortet, dennoch gab es bislang nur begrenzte Erkenntnisse über die spezifischen Funktionen dieser Proteine.¹⁵⁴ AKT1 ist ubiquitär exprimiert, wohingegen AKT2 vorrangig in Muskelzellen und dort an den Mitochondrien lokalisiert ist. Für AKT3 konnte eine erhöhte Expression in Neuronen beobachtet werden.^{154, 161-163} Bisherige Studien setzten hauptsächlich auf *Knock-out*-Modelle, die jedoch nur bedingt Aufschluss über die Funktionen der Isoformen geben können. In diesen Studien konnte für die AKT2-Isoform ein diabetischer Phänotyp beobachtet werden.^{164, 165} Das vollständige Fehlen eines Proteins kann dennoch zu verzerrten Interaktionsprofilen führen und Zellen dazu veranlassen, auf kompensatorische Signalwege zurückzugreifen. Um diese Einschränkungen zu überwinden, können spezifisch bindende Sonden-Moleküle eingesetzt werden.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ In Anlehnung an das ABPP, wird das Sonden-Molekül durch ein spezifisches Element ausgestattet, welches eine selektive Bindung in einer Tasche ermöglicht. Weiter wird es mit einer elektrophilen Gruppe dekoriert, was die nukleophile Modifikation einer Aminosäuren-Seitenkette bewirkt.¹⁶⁹

Durch die Integration einer Alkin-Gruppe in das Molekül wird es möglich, mittels Click-Chemie Reportergruppen wie Fluorophore oder Affinitäts-Tags (z.B. Biotin) bioorthogonal einzubringen.¹⁷⁰⁻¹⁷² Diese modifizierten Moleküle erlauben die präzise Untersuchung der Protein-Interaktionen und der zellulären Lokalisation der verschiedenen AKT-Isoformen, ohne die durch *Knock-out*-Modelle verursachten Kompensationsmechanismen auszulösen. Ziel dieses Projekts war es, das entwickelte Sonden-Molekül in zellulären Systemen zu evaluieren. In ersten Studien sollten hierfür Zell-Lysate nach der Behandlung mit dem Molekül generiert und anschließend über eine CuAAC-Reaktion mit einem Fluorophor modifiziert werden. Die anschließende Visualisierung in einem Gel sollte Aufschluss über die Selektivität des Sonden-Moleküls geben. Im zweiten Ansatz sollte die Alkin-Gruppe der Verbindung mit Biotin-Azid reagieren, um einen Streptavidin-Pulldown zu ermöglichen. Nach der Visualisierung und Evaluation der Pulldown-Fractionen sollte ein *on-bead Digest* durchgeführt werden. Diese Methode würde es ermöglichen, Informationen über mögliche Interaktionspartner zu erlangen.

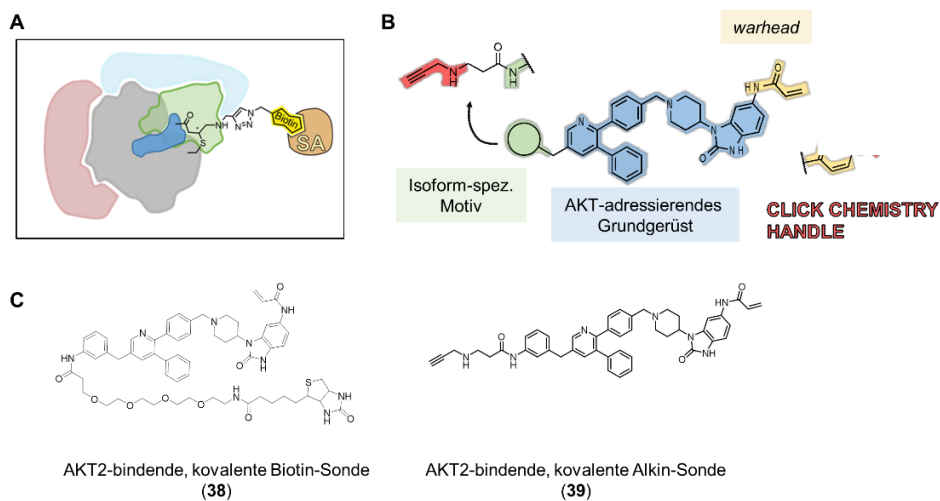


Abbildung 56. A: Schematische Darstellung einer AKT-bindenden Sonde, welches ein Cystein kovalent modifiziert. Über eine Click-Reaktion wurde eine Biotin-Gruppe eingebracht, welche Streptavidin (SA) binden kann. In blau und rot sind mögliche Interaktionspartner schematisch gekennzeichnet. **B:** Schematische Darstellung einer AKT-Sonde. Neben dem AKT-adressierendem Grundgerüst (blau), dem Isoform-spezifischen Motiv (grün) und der elektrophilen Gruppe (*warhead*, gelb), wird auch eine Alkin-Gruppe eingebracht, welche weiter funktionalisiert werden kann (rot). **C:** Chemische Strukturen, der in dieser Arbeit verwendeten Sonden. Die Abbildung wurde von Dr. Lena Quambusch und Dr. Laura Depta übernommen. Die Sonden wurden von Dr. Lena Quambusch entworfen und in Zusammenarbeit mit M.Sc. Maria Beerbaum synthetisiert.

Ergebnisse

Um das gewonnene Sonden-Molekül evaluieren zu können, wurde als geeignetes Zelluläres System die Krebszelllinie PANC1 ausgewählt. Hierbei stand zum einen die Fragestellung im Fokus, ob die -Sonde selektiv im zellulären Kontext an AKT2 bindet. Weiter war es von Interesse Einblicke in das Interaktionsprofil von AKT2 zu erlangen. Wichtig ist hierbei zu bedenken, dass es sich um die inaktive Konformation von AKT2 handelt, da der Inhibitor diese Konformation stabilisiert. In einem ersten Schritt wurden PANC1-Zellen über Nacht unter vier unterschiedlichen Bedingungen behandelt. In der ersten Kondition wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle behandelt (A). In der zweiten Kondition wurde eine bereits mit Biotin modifizierte Verbindung **38** als positive Kontrolle (B) verwendet. Als negative Kontrolle wurden die Zellen für 4 Stunden mit Borussertib behandelt und anschließend mit der Alkin-Sonde **39** (C). In dieser Bedingung sollten alle AKT-Proteine kovalent besetzt werden, um Informationen über *off-target* Aktivitäten der Sonde zu erhalten. In der vierten Kondition (D) wurden die Zellen mit der Alkin-Sonde **39** behandelt (Tabelle 4)

Tabelle 4 Übersichtstabelle über die Behandlung der PANC1 Zellen für folgende Pulldown-Experimente.

Behandlungsschema PANC1 Zellen			
Kondition	Behandlung	Eigenschaft	Funktion
A	DMSO	-	Kontrolle
B	1 μ M RL3822 (38)	Biotin-modifizierte Verbindung	Positive Kontrolle
C	1 μ M Borussertib (4 h), dann 1 μ M RL3787 (39)	Vorblockierung von AKT mit panCAAI	Negative Kontrolle
D	1 μ M RL3787 (39)	Alkin Sonden-Molekül	

In-Gel Fluoreszenz Experimente

Nach der Behandlung wurden Zell-Lysate generiert und mit einem *Click-Master-Mix* bestehend aus Cu(II)-Sulfat, TCEP und TBTA behandelt. Zusätzlich wurde in einem ersten Versuch Cy5.5-Azid hinzugegeben und über Nacht reagieren gelassen. Anschließend wurde das Lysat gefällt, gewaschen und wieder resuspendiert. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Fluoreszenz visualisiert. Die Visualisierung sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die Alkin-Sonde spezifisch an die AKT-Isoformen bindet und ob *off-target*-Bindungen auftreten. Die Ergebnisse dieses Experiments sind essenziell, um die Selektivität und Wirksamkeit des Sonden-Moleküls zu bewerten.

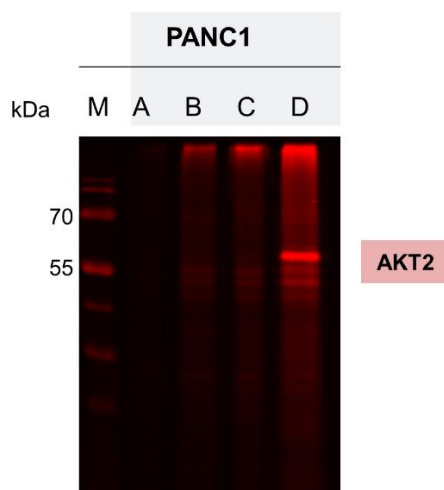


Abbildung 57. *In-Gel* Fluoreszenz Experiment mit dem Farbstoff Cy5.5. A: DMSO-Kontrolle; B: Positiv Kontrolle mit RL3822 (AKT2-spezifische Biotin-Sonde **38**); C: Negativ Kontrolle (Vorbehandlung mit kovalent-allosterischem Inhibitor Borussertib, dann Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**)); D: Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**).

In Abbildung 57 ist ersichtlich, dass für die ersten beiden Konditionen A und B keine Fluoreszenz-Banden zu erkennen sind, was erwartet wurde, da in diesen Proben keine Alkingruppe vorhanden war, die mit dem Azid reagieren konnte. Interessanterweise konnte auch in Kondition C, welche als negative Kontrolle dienen sollte, keine Bande beobachtet werden.

Dies deutet darauf hin, dass die Behandlung mit Borussertib ausreichte, um alle drei AKT-Isoformen vollständig zu blockieren, sodass die Alkin-Sonde **39** nicht mehr an AKT binden konnte. Außerdem deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die -Sonde auch nicht unspezifisch an andere Proteine bindet. In Kondition D konnte eine prominente Bande im Bereich von 60 kDa beobachtet werden, was der Größe von AKT entspricht. Zusätzlich wurden auch weniger intensive Banden detektiert. Diese Banden könnten auf unspezifische Bindungen anderer Proteine hinweisen, die von der Alkin-Sonde **39** erfasst wurden.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass die Alkin-Sonde **39** vermeintlich spezifisch an AKT bindet und keine unspezifischen Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht, was sie zu einem potenziellen Werkzeug für die weiterführende Forschung an AKT macht.

Pulldown-Experimente

In den vorangegangenen Experimenten konnte demonstriert werden, dass die entwickelte -Sonde spezifisch an AKT in PANC1-Zellen bindet. Zudem wurde gezeigt, dass die Click-Reaktion in den Lysaten erfolgreich durchgeführt werden konnte, wodurch das Alkin funktionalisiert wurde. Im Anschluss daran wurde das Alkin mit Biotin-Azid modifiziert. Es wurden drei verschiedene, mit Streptavidin modifizierte Agarose-Beads getestet, die sich hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit, Bindungskapazität sowie der Vorblockierung mit bovinem Serumalbumin (BSA) und der Zusammensetzung des Aufbewahrungspuffers unterschieden. BSA dient dazu, unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren, kann jedoch in nachfolgenden MS/MS-Experimenten zu einem erhöhten Hintergrundsignal führen (Tabelle 5).

Tabelle 5 Übersichtstabelle der Eigenschaften, der in dieser Arbeit getesteten Streptavidin-Beads.

Streptavidin-Beads					
Eintrag	Name	Oberflächen-Beschaffenheit	Kapazität	Blockiert	Puffer-Bestandteile
1	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	hydrophob	950 bis 1,500 pmol/mg Beads	Vorblockiert mit BSA	-
	Dynabeads MyOne Streptavidin C1		>2.500 pmol/mg Beads		
3	Dynabeads M-270 Streptavidin	hydrophil		Nicht vorblockiert mit BSA	-

Nach der Modifikation der vier Konditionen (A-D) mit Biotin-Azid wurden die Lysate mit Methanol gefällt, gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Die Proben wurden auf die drei unterschiedlichen Beads gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben mittels Western Blot, wobei die Membran mit einem spezifischen AKT2-Antikörper gefärbt wurde, um den Erfolg des Pulldowns zu untersuchen. Abbildung 58 zeigt, dass für Kondition A (DMSO-Kontrolle) und die negative Kontrolle C kein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, was darauf hinweist, dass kein Pulldown von AKT2 stattgefunden hat. Hingegen wurde in den Konditionen B (Biotin-Sonde **38**, positive Kontrolle) und D (Alkin-Sonde **39**) bei allen drei Beads ein erfolgreicher Pulldown beobachtet.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Sonde **39** an AKT2 bindet und die Reaktion mit Biotin-Azid erfolgreich verlaufen ist.

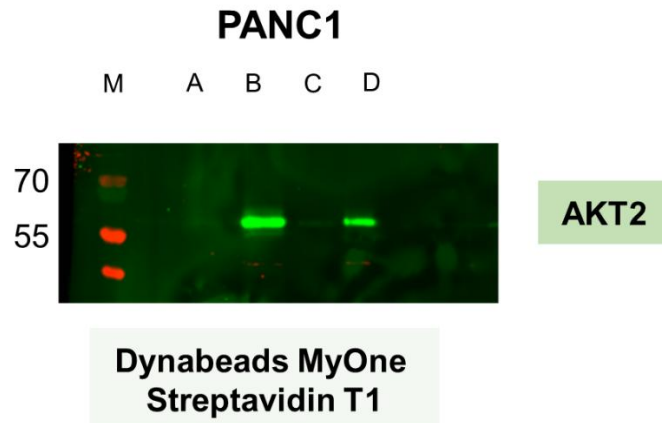


Abbildung 58. Pulldown von AKT2 mit Hilfe von Streptavidin-Beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1). Zur Kontrolle des Erfolgs des Pulldowns wurden die Fraktionen mit einem AKT2-selektiven AK angefärbt. A: DMSO-Kontrolle; B: Positiv Kontrolle mit RL3822 (**38**) (AKT2-spezifische Biotin-Sonde); C: Negativ Kontrolle (Vorbehandlung mit kovalent-allosterischem Inhibitor Borussertib, dann Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**)); D: Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**).

Zusätzlich wurden Western Blots angefertigt und vergleichend mit AKT1- und AKT3-spezifischen Antikörpern behandelt.

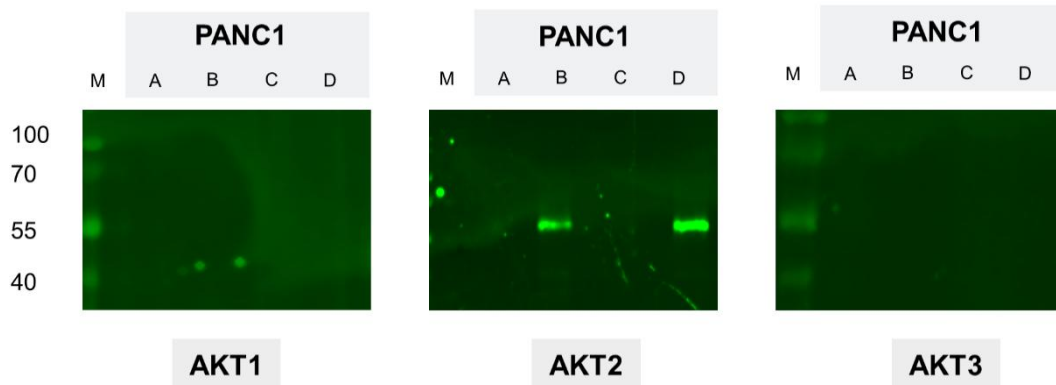


Abbildung 59. Immuno-Blots des Pulldown-Experiments in PANC1 Zellen mit den Bedingungen A- D. Es wurde jeweils mit einem AKT-Isoform-spezifischem AK angefärbt, um das Isoformen-Selektivitätsprofil zu verdeutlichen. A: DMSO-Kontrolle; B: Positiv Kontrolle mit RL3822 (AKT2-spezifische Biotin -Sonde **38**); C: Negativ Kontrolle (Vorbehandlung mit kovalent-allosterischem Inhibitor Borussertib, dann Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde)); D: Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**).

In Abbildung 59 ist zu erkennen, dass in keinem der Pulldown-Experimente ein erfolgreicher Pulldown der anderen beiden Isoformen beobachtet werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Sondenmoleküle spezifisch an AKT2 binden.

MS/MS-Experimente¹⁷

Um die Selektivität der Sonden **38** und **39** gegenüber AKT2 eingehender zu untersuchen, wurden die Beads einer Verdauung mit den Proteasen LysC und Trypsin unterzogen und anschließend in MS/MS-Experimenten analysiert. Diese Methode ermöglicht zudem Rückschlüsse auf mögliche Interaktionspartner der Kinase in PANC1-Zellen. Abbildung 60A zeigt das Streudiagramm (*Volcano-Plot*) die statistische Signifikanz (P-Wert) im Vergleich zum Ausmaß der Veränderung (*Fold-Change*) zwischen den Konditionen B und C. Abbildung 60B präsentiert das Ergebnis des Vergleichs der Konditionen D und A.

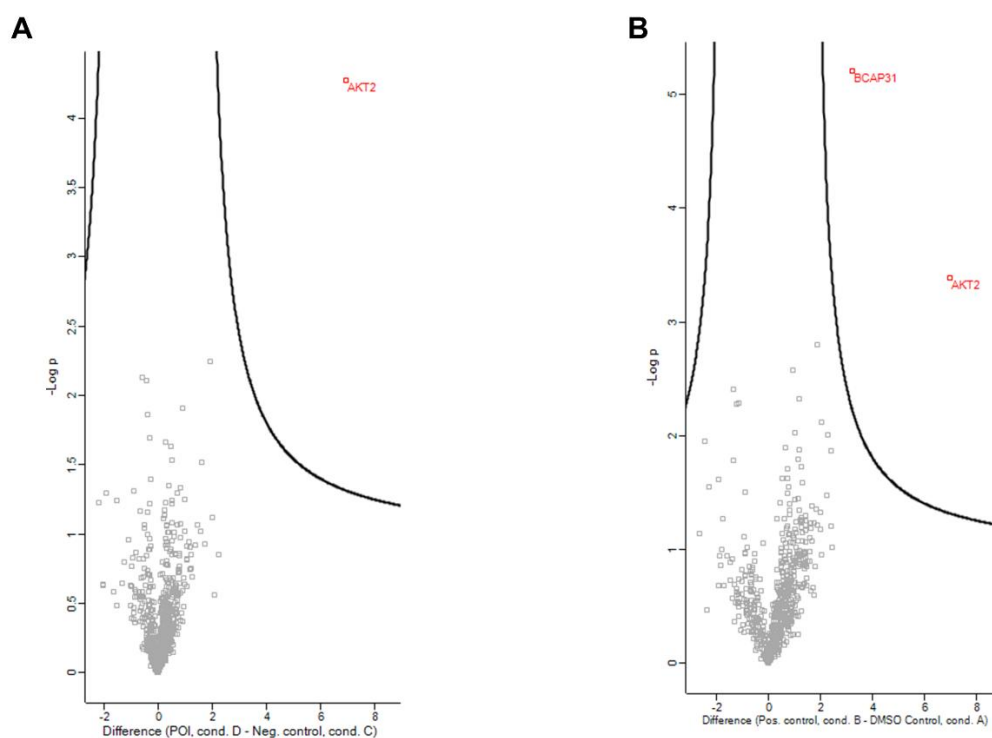


Abbildung 60. *Volcano-Plots* der durchgeführten MS/MS-Experimente. **(A)**: Auftragung der Kondition D gegen C. **(B)**: Auftragung der Kondition B gegen A. Die Auswertung der MS/MS-Experimente wurde von Dr. Petra Janning durchgeführt.

In einem ersten Experiment, in dem die Anreicherung der Proteine aus den Konditionen D und C miteinander verglichen wurde, konnte ein herausragendes Selektivitätsprofil für AKT2 beobachtet werden.

¹⁷ Die Analyse der MS/MS-Experimente wurde von Dr. Petra Janning durchgeführt.

Es wurde keine signifikante Anreicherung anderer Proteine festgestellt (Abbildung 60). In einem zweiten Experiment, das darauf abzielte, mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, zeigte sich neben der Anreicherung von AKT2 auch eine Anreicherung des Proteins BCAP31 (Abbildung 60). Dieses Protein ist ein ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein, das sowohl am Endoplasmatischen Retikulum als auch an Mitochondrienmembranen lokalisiert ist. BCAP31 fungiert als Chaperon und spielt eine regulatorische Rolle bei der Apoptose. Bisher war BCAP31 nicht als Interaktionspartner von AKT2 bekannt.¹⁷³ Um diese Interaktion in einem unabhängigen Experiment zu verifizieren, wurden die Pulldown-Fractionen mittels Western Blot mit einem BCAP31-spezifischen Antikörper analysiert.

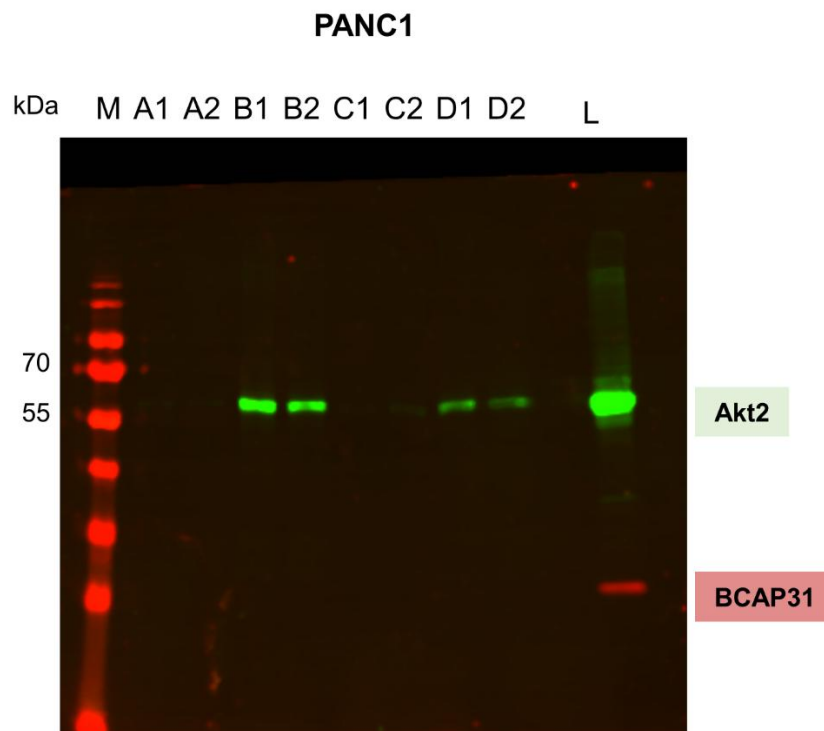


Abbildung 61. Immuno-Blot der Pulldown-Fractionen und des Lysats von PANC1-Zellen. Angefärbt in grün mit einem AKT2-spezifischen AK und rot angefärbt mit einem BCAP31-spezifischen AK. A: DMSO-Kontrolle; B: Positiv Kontrolle mit RL3822 (AKT2-spezifische Biotin -Sonde **38**); C: Negativ Kontrolle (Vorbehandlung mit kovalent-allosterischem Inhibitor Borussertib, dann Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**)); D: Behandlung mit RL3787 (Alkin-Sonde **39**); 1: T1-Beads, 2: M270-Beads.

Dabei zeigte sich, dass das Protein zwar in PANC1-Zellen vorhanden ist, jedoch in den Pulldown-Fractionen nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 61).

Ein möglicher Grund dafür könnte die geringe Konzentration des Proteins nach dem Pulldown sein, die nur in MS/MS-Experimenten aufgrund der höheren Sensitivität detektiert werden kann. Dennoch sollten in unabhängigen und erneuten MS/MS-Studien diese Ergebnisse erneut verifiziert werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend wurden in diesem Kapitel kovalente Sonden-Moleküle untersucht, die speziell die AKT2-Isoform in einem komplexen zellulären Kontext adressieren sollen. Exemplarisch wurden diese Sonden in PANC1-Zellen evaluiert. Ziel der Untersuchungen war es, die komplexe Funktion der verschiedenen AKT-Isoformen besser zu verstehen, um letztlich die Entwicklung isoform-spezifischer Wirkstoffe zu ermöglichen, da die zielgerichtete Adressierung von AKT bisher erschwert war. Hierfür kamen Alkin- und Biotin-modifizierte AKT2-Inhibitoren zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass das Alkin in Zell-Lysaten mittels Click-Reaktionen erfolgreich mit Biotin- bzw. Fluorophor-Aziden modifiziert werden konnte. Diese Modifikation ermöglichte in Pulldown-Experimenten den Nachweis, dass die Sonde spezifisch an AKT2 bindet. Die Spezifität wurde durch MS/MS-Experimente bestätigt, da keine anderen Proteine angereichert wurden. Darüber hinaus wurde BCAP31 als potenzieller Interaktionspartner identifiziert, obwohl diese Interaktion in Western-Blot-Studien nicht validiert werden konnte. Zukünftig könnte diese Interaktion in Immunpräzipitations-Experimenten genauer untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von *Crosslinkern*, um den Interaktionspartner kovalent an AKT2 zu binden. Es ist denkbar, dass die zahlreichen Waschschriffe schwache Bindungen der Interaktionspartner lösen, sodass diese nicht mehr detektiert werden können.

Zusammenfassung und Ausblick

Die GTPase KRAS, insbesondere seine mutierten Varianten, wurde in vielen tödlich verlaufenden Krebsarten als onkogener Treiber identifiziert und stellt aufgrund seiner zentralen Rolle einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Präzisionsmedizin dar. 2013 gelang es der akademischen Gruppe von KEVAN SHOKAT, die KRAS^{G12C}-Variante erstmals mit niedermolekularen Verbindungen kovalent zu adressieren und legte damit den Grundstein für die Entwicklung der Wirkstoffe Sotorasib (**4**) und Adagrasib (**1**). Zudem veröffentlichte die Gruppe um SHOKAT mutanten-spezifische Inhibitoren für die KRAS-Mutanten G12D, G12S und G12R und präsentierten neuartige reaktive Gruppen, welche gezielt die jeweils mutierte Aminosäure kovalent adressieren. Obwohl die Translation dieser reaktiven Gruppen in den biologischen Kontext noch weiter untersucht und gegebenenfalls optimiert werden muss, stellen diese Verbindungen bereits wertvolle Werkzeuge dar, um die biologische Relevanz sowie den onkogenen Wirkmechanismus der KRAS-Mutanten besser zu verstehen. Dies ist eine essentielle Grundlage für die Entwicklung neuer Inhibitoren. Diese Beispiele zeigen eindrucksvoll, wie akademische Forschung die Basis für innovative Behandlungsansätze bieten kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten für die beiden Cys-mutierten Onkogene KRAS^{G12C} und KRAS^{G13C} neue Verbindungen entwickelt werden, die die jeweilige Mutante kovalent adressieren. Zunächst wurde angestrebt, durch *Screening*-Methoden oder Struktur-basiertes Design potenzielle Startpunkte für neue Verbindungen zu identifizieren. Im nächsten Schritt wurden Syntheserouten etabliert, die eine fokussierte Substanzbibliothek ermöglichen sollten. Diese Bibliothek wurde anschließend in biochemischen und zellulären Testsystemen auf ihre Bindungseigenschaften und Wirksamkeit hin untersucht, wobei in einigen Fällen neue Testsysteme entwickelt wurden. Ein wichtiger Bestandteil war auch die Proteinkristallisation in Komplex mit den neu generierten Molekülen, um strukturelle Einblicke in die Ligandenbindung im Zielprotein zu gewinnen und die chemische Optimierung der nächsten Generation von KRAS-gerichteten Molekülen zu unterstützen.

Im ersten Projekt sollte eine in der Literatur beschriebene Platten-basierte *Screening*-Methode verwendet werden, um neue Startpunkte zu identifizieren, die als kovalente Modulatoren für KRAS^{G12C} dienen könnten. Zu Beginn wurde ein kleines Fragment designt und synthetisiert, das aus einem Strukturmotiv bestand, welches bereits aus zugelassenen KRAS^{G12C}-Inhibitoren bekannt ist. Das Molekül wurde an zwei Stellen weiter modifiziert, indem eine reaktive Acrylamid-Gruppe eingeführt wurde, die an das erworbene Cystein der onkogenen Mutante binden kann, sowie mit einem Alkin versehen wurde. Dies konnte anschließend in einem Platten-basierten Verfahren über eine CuAAC-Reaktion mit einer Bibliothek von Aziden derivatisiert werden. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass die Platte mit den reagierten Verbindungen direkt im Anschluss ohne weitere Aufarbeitung in einem zellulären Assay auf ihre biologische Aktivität getestet werden konnte. Insgesamt konnten sechs *Hit*-Verbindungen identifiziert werden. Beim Vergleich der gesamten Azid-Bibliothek fiel auf, dass die *Hit*-Azide eine Methylgruppe an der (*S*)-konfigurierten Methylengruppe tragen, was darauf hindeutet, dass dieses Motiv für die biologische Aktivität maßgeblich verantwortlich ist. Zur Verifizierung der *Hits* wurde zunächst die *CovClick*-Methode gewählt, bei der das Protein aufgrund der Eigenschaften der Bindungstasche geeignete Binder selektiert. Die Herangehensweise mit dem kleinen Bindungsmotiv der Alkin-Sonde für KRAS^{G12C} erwies sich jedoch als nicht geeignet, da das Fragment wahrscheinlich nur schwach an das Zielprotein bindet. Da das kovalent modifizierte Cystein lösungsmittlexponiert an der Oberfläche von KRAS lokalisiert ist, könnte das Fragment verschiedene lösungsmittel-exponierte Konformationen annehmen. Eine Orientierung in Richtung der SWIIP-Tasche, die eine selektive Reaktion mit Molekülen in dieser Tasche erfordert, konnte nicht gewährleistet werden. Daher wurden die gefundenen *Hits* in herkömmlicher Weise erneut synthetisiert. Anschließend wurden MS-basierte Untersuchungen an einem *Cys-light* Konstrukt des Zielproteins durchgeführt, wobei die kovalente Modifikation aller Verbindungen beobachtet werden konnte. Mit Hilfe eines CTG-Assays an H358-Zellen (KRAS^{wt}/KRAS^{G12C}) wurden die *Hit*-Verbindungen erneut in einer dosisabhängigen Weise charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass diese - im Vergleich zu bekannten KRAS^{G12C}-Inhibitoren - eine moderate zelluläre Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich aufwiesen.

Dennoch muss betont werden, dass die Moleküle nicht optimiert sind und daher lediglich als Ausgangspunkte für neuartige Inhibitoren dienen können. Die gefundenen Moleküle verfügen über synthetische Exit-Vektoren, die eine weitere Diversifizierung der Inhibitoren ermöglichen. Zur Verbesserung der Bindung innerhalb des Proteins und der biologischen Wirkweise könnten Ko-Kristallstrukturen herangezogen werden, die das Design verbesserter Verbindungen unterstützen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht vollständig erreicht wurde. Dennoch konnten optimierte Protein-Expressions- und Reinigungsmethoden entwickelt werden, die entscheidend für eine erfolgreiche Proteinkristallisation sind. Es konnten Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die das Lösen einer Struktur von KRAS^{G12C} ermöglichten. Das Generieren einer Liganden-gebundenen Struktur bleibt jedoch eine Herausforderung für zukünftige Arbeiten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der *Screening*-Ansatz einen wertvollen Startpunkt geliefert hat, und niedermolekulare Verbindungen mit biologischer Aktivität in relevanten Krebszell-Modellen identifiziert wurden. Diese Verbindungen können einerseits weiter optimiert werden, um als neuartige KRAS^{G12C}-Inhibitoren zu dienen, andererseits bietet diese Methodik auch einen vielversprechenden Ansatz für die Identifikation von Inhibitoren anderer Zielproteine.

Ein zweites Projekt widmete sich der KRAS^{G13C}-Mutante, die bislang weitgehend unerforscht ist, aber dennoch eine Rolle in Lungenkrebs spielt. GOEBEL *et al.* berichteten erstmals über orthosterische, GDP-basierte Nukleotid-Analoga, die ein Acrylamid als reaktive Gruppe tragen und so das Cys13 kovalent adressieren können. In vorangegangenen Studien wurde jedoch nur bei erhöhtem pH-Wert eine vollständige Proteinmodifikation erreicht, was den Bedarf einer Optimierung verdeutlicht. Ziel dieser Optimierung war es, mit Hilfe eines rigideren Linkersystems (im Vergleich zu den bereits verwendeten linearen Linkern) die Vororientierung zu verbessern. Über *Docking*-Studien wurden geeignete Linker identifiziert, die im nächsten Schritt synthetisiert wurden. Eine neue konvergente Syntheseroute ermöglichte es, neun neuartige GDP-basierte Verbindungen mit unterschiedlichen Ringsystemen als Linker zu generieren.

In anschließenden pH- und Zeit-abhängigen massenspektrometrischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die neuen Modulatoren das gewünschte Cys13 in ähnlicher Weise wie das Referenzmolekül eda-GDP (mit einem linearen Linker) adressieren, jedoch keine signifikante Verbesserung der Reaktivität erzielt werden konnte. Es zeigte sich auch, dass die neuen Inhibitoren KRAS^{G12C} und KRAS^{wt} nahezu vollständig aussparen und somit eine hohe Selektivität aufweisen. Mit Hilfe eines SOS Nukleotid-Austausch- und eines Pull-Down-Experiments konnte zudem gezeigt werden, dass das beste Molekül den Nukleotid-Austausch verhindert und das Protein im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand blockiert. Ebenso wird dadurch die Bindung des Effektorproteins cRaf unterbunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die es ermöglichten, eine Kristallstruktur von KRAS^{G13C} im Komplex mit den Molekülen zu erhalten. Strukturelle Einblicke in die Ligandenbindung zeigten, dass das Molekül kovalent Cys13 modifiziert. In Kooperation mit Prof. Dr. Hugo Verli wurden MD-Studien durchgeführt, die mögliche Konformationen der Linker aufzeigten. Dabei wurde deutlich, dass nur eine kleine Population der Linker-Konformationen die richtige Orientierung einnimmt, um mit Cys13 irreversibel zu reagieren. Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Reaktivität der Liganden gegenüber Cys13 könnte der Einsatz von reaktiveren Gruppen sein. Es wäre ebenfalls von hohem Interesse, den pK_a-Wert des Cys13 experimentell zu bestimmen.

Neben der orthosterischen Adressierung von KRAS^{G13C} wurde im Rahmen eines weiteren Projekts eine allosterische Inhibition mithilfe niedermolekularer Verbindungen in der SWIIP angestrebt. Analog zu den KRAS^{G12C}-Inhibitoren sollten neue Moleküle entwickelt werden, die anstelle des Cys12 das näher an der Nukleotid-Bindetasche lokalisierte Cys13 kovalent binden. Ausgangspunkt für das Moleküldesign war das Grundgerüst des G12D-Inhibitors MRTX1133 (**2**), das sich durch eine verbesserte reversible Affinität auszeichnet. Im ersten Schritt wurde die zu überbrückende Distanz zwischen den Codons 12 und 13 vermessen, um in nachfolgenden kovalenten *Docking*-Studien geeignete Linker zu identifizieren. Diese Linker wurden mit einem Acrylamid modifiziert, das eine irreversible Bindung an das gewünschte Cys13 eingehen kann.

Durch eine synthetische Route konnten die gewünschten Verbindungen hergestellt werden. Anschließend konnte in MS-Studien mit dem KRAS^{G13C} (*Cys-light*)-Konstrukt eine kovalente Bindung der Verbindungen an das Zielprotein vernommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die SWIIP nicht nur die G12X-Varianten, sondern auch die bislang in der Literatur kaum beschriebenen G13C-Variante mittels allosterischer, niedermolekularer Verbindungen adressiert werden kann. In Zusammenarbeit mit der AG Bauer des Universitätsklinikums Essen wurden Zelllinien generiert, welche eine bedingte Abhängigkeit zu dem KRAS^{G13C}-Onkogen aufweisen. Hierbei konnte erstmalig für die optimierte Verbindung RL4000 (**36**) ein zellulärer Effekt beobachtet werden. Für die Zukunft bleibt die Optimierung dieser neuartigen Modulatoren entscheidend, da sie bislang weder eine optimale Reaktivität aufweisen noch in niedrigen Konzentrationen signifikante zelluläre Effekte erzielen. Daher können sowohl alternative Linker, die die präzise Orientierung der reaktiven Gruppe erleichtern, als auch eine Diversifizierung der Positionen 2' und 7' zu einer verbesserten reversiblen Bindung der Inhibitoren beitragen. Weiter können die hier erhaltenen Verbindungen wichtige Werkzeuge sein, um die Biologie dieser bestimmten KRAS Variante im Krebsgeschehen besser verstehen zu können, um somit zukünftige verbesserte Behandlungsstrategien zu entwickeln. Hierzu könnten die Moleküle mit einer Alkin-Funktionalität ausgestattet werden, welche es ermöglicht Biotin-Motive oder Fluorophore über die CuAAC einzubringen. Diese könnten dann zum einen über Pulldown Experimente und weiter LC-MS/MS Analysen nach tryptischem Verdau Aufschluss über das Interaktom dieser Variante liefern. Zum anderen wären nach Reaktion mit einem Fluorophor auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen möglich, welche die zelluläre Lokalisation ermöglichen würde.

Insgesamt gelang es in dieser Arbeit sowohl die bereits gut untersuchte KRAS^{G12C} Mutante, als auch die weniger erforschte G13C-Variante über unterschiedliche Ansätze erfolgreich kovalent zu adressieren. Besonders hervorzuheben ist die erstmalig gelungene Modulation von KRAS^{G13C} über eine allosterische Herangehensweise mit niedermolekularen Verbindungen und die erzielten zellulären Effekte.

Dies könnte das Fundament für die Entwicklung hoch-potenter G13C-Inhibitoren darstellen, was zu einem verbesserten biologischen Verständnis und einer zukünftigen Behandlung dieser Mutante führen könnte.

In einem letzten Projekt wurden kovalente Sondenmoleküle charakterisiert, die spezifisch die AKT2-Isoform im komplexen zellulären Umfeld adressieren sollen, insbesondere in PANC1-Zellen. Ziel ist es, durch gezielte Untersuchung der AKT-Isoformen ein tieferes Verständnis für deren individuelle Funktionen zu gewinnen, um Isoform-spezifische Wirkstoffe zu entwickeln – ein bisheriges Hindernis in der gezielten Adressierung von AKT. Die Untersuchungen umfassten die Verwendung von Alkin- und Biotin-modifizierten AKT2-Inhibitoren, die in Zelllysaten über Click-Reaktionen erfolgreich mit Biotin- oder Fluorophor-Aziden markiert werden konnten. Diese Markierungen ermöglichten in Pulldown-Experimenten den spezifischen Nachweis der AKT2-Bindung. Diese Spezifität wurde in MS/MS-Experimenten bestätigt, bei denen keine Anreicherung anderer Proteine erfolgte. Ein potenzieller Interaktionspartner, BCAP31, wurde identifiziert, allerdings konnte diese Interaktion durch Western-Blot-Studien oder andere unabhängige Experimente noch nicht bestätigt werden. Für künftige Studien wäre die Validierung dieser Interaktion durch Immunpräzipitations-Experimente sinnvoll; auch der Einsatz von *Crosslinkern* könnte hilfreich sein, um Interaktionspartner kovalent an AKT2 zu binden und deren Nachweis zu sichern. Dies könnte mögliche Verluste schwacher Bindungen aufgrund mehrerer Waschschriffe im Protokoll reduzieren und so zur Identifikation weiterer AKT2-spezifischer Interaktionen beitragen.

Experimenteller Teil

Material und Methoden

Allgemeine Anmerkungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in analytischem Reinheitsgrad bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Geräte

Bezeichnung	Produktname / Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren	CB 150, WTB Binder
Fluoreszenz-Imager	Odyssey CLx Imaging System, LI-COR Biosciences
FPLC	ÄKTA pure, Cytiva
Gelelektrophorese-Systeme	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad, Hercules
	Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, Hercules
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer, Microfluidics
Inkubatoren	MaxQ™ 8000, Thermo Fisher Scientific
Kristallisationsplatten-Imager	Rock Imager 1000, Formulatrix
LC-MS-System	Velos Pro Dual-Pressure Lineare-Ionenfallen-Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific
Mikroskope	EVOS FLoid, Thermo Fisher Scientific
	EVOS XL Core, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Lesegerät	EnVision 2104 Multilabel Plattenleser, PerkinElmer
Mikrotiterplatten-Pipettiergerät	Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser, ThermoFisher Scientific
NMR Systeme	AV500 Avance III HD, Bruker
pH Messgerät	SevenCompact, Mettler Toledo
Pipetten	Research plus, Eppendorf
	Xplorer, Eppendorf
Pipettierroboter	LCP-Mosquito, TTP Labtech

Experimenteller Teil

Plattenschüttler	Titramax 100, Heidolph
Röntgengenerator	D8 Venture Diffraktometer, Röntgenquelle: $\text{CuK}\alpha$ 3.0, Detektor: Photon II, Bruker
Rotationsverdampfer	Rotavapor, Büchi
Rotoren	Sorvall SA 600, FiberLite F20-6x100, FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	Herasafe KS12/K"18, Thermo Fisher Scientific
Thermoschüttler	ThermoMixer C, Eppendorf
Transfer-Powersystem	Pierce Power Station, Thermo Fisher Scientific
Tröpfchendispensierer	Echo 520 Liquid Handler, LabCyte
Vakuumkonzentrator	Concentrator Plus, Eppendorf
Zellzähler	Countess II, Invitrogen
Zentrifugen	Zentrifuge 5804R/5424/5424R, Eppendorf Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname / Hersteller
Cryo-Loops	Mounted CryoLoop, Hampton Research
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12-14 kDa, Carl Roth
FPLC-Säulen	HiLoad 16/60 Superdex® 75 pg, GE Healthcare HiLoad 16/60 Superdex® 200 pg, GE Healthcare Ni-NTA Agarose, Qiagen Ni-NTA Superflow Cartridge, 5 mL, Qiagen Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare
Gel-Blottingpapier	Gel-Blottingpapier GB005 Dicke 1,5 mm, Whatman

Experimenteller Teil

HPLC Säulen	50/3 Nucleodur C18 gravity Säule (1,8µm), Macherey-Nagel AdvanceBio Desalting-RP Cartridge, Agilent Technologies Hypersil GOLD-Säule, ThermoFisher Scientific PepMap100 RSLC C18 nano-HPLC Säule, Dionex ProntoSIL® 120-5-C18-AQ, Bischoff
Kationenaustauscher	Ionenaustauscher I, Merck
Kristallisationsplatten	EasyXtal 15-well Tool X-Seal, NeXtal Biotechnologies 96-well sitting drop iQ plates, TTP Labtech
Kristallisations-Screens	JCSG Core I-IV Suites, Qiagen PACT Suite, Qiagen PEGI-II Suites, Qiagen Additive HT, Hampton Research
Mikrotiterplatten	MicroWell 96 well PS, F-Boden, transparent, Nunc Zellkultur Microplatte, 384 well, PS, F-Boden, weiß, TC, Greiner Bio-One
Nukleotide	Guanosin, Alfa Aesar GMP, Alfa Aesar GDP, Jena Bioscience GppCp, Jena Bioscience GppNHp, Jena Bioscience GTP, Jena Bioscience mantdGDP, Jena Bioscience

Experimenteller Teil

Objektträger	Countess™ Zellzählungs-Kammerobjektträger, Invitrogen
Pipettenspitzen	Verschiedene Größen, Starlab
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF Membran, 0,45 µM, Merck, Millipore
Referenzverbindungen	AMG 510, MedChemExpress ARS-1620, MedChemExpress AZD5363/Capivasertib, SelleckChem Borussertib, AG Rauh Dortmund Doxorubicin, LC Labs MRTX849, MedChemExpress Staurosporin, LC Labs MRTX1133, BLD Pharm
Serologische Pipetten	Verschiedene Größen, Starlab
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S, 0,45 µM, Sarstedt Filtropur S, 0,2 µM, Sarstedt
Zellkulturflaschen	TC25/TC75/TC175-Flaschen Standard, Sarstedt TC-Platte 6 well, Standard, F, Sarstedt
Zellschaber	Zellschaber mit 2-Positions-Klinge (16 cm), Sarstedt
Zentrifugalkonzentratoren	Amicon® Ultra-4/-15 MWCO 10 kDa, Merck

Experimenteller Teil

Medien, Proteine und Reagenzien

Bezeichnung	Produktname, Hersteller
BCA Protein Assay Kit, Pierce	Thermo Fisher Scientific
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
cOmplete ULTRA Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DPBS-Puffer	Gibco, Invitrogen
FBS, EU approved	Gibco, Invitrogen
Intercept (TBS) Protein-Free Blocking Buffer	Li-COR Biosciences
Medien	DMEM, high glucose, GlutaMax, Gibco, Invitrogen RPMI-1640 GlutaMax, Gibco, Invitrogen
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDA	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Invitrogen
Trypsin-Protease, Pierce, MS Grade	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA, Phenolrot (0,25 %)	Gibco, Invitrogen

Proteinisolation und -Reinigung

Die Proteinexpression und -Aufreinigung wurde von Andreas Arndt, Dr. Lisa Goebel, Jan Niklas Wiese und Vincent Wagner (Bachelorarbeit Sommersemester 2023) etabliert und durchgeführt. Die dazugehörigen Methoden wurden bereits in den Abschlussarbeiten ausführlich beschrieben.

Proteinkristallisation

Experimente zur Proteinkristallisation wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Müller, Dr. Janina Niggenaber, Jan Niklas Wiese und Vincent Wagner durchgeführt.

Probenvorbereitung

Vor der Durchführung der Kristallstudien wurde das Protein für eine definierte Zeitspanne mit dem Liganden im Überschuss inkubiert. Um die Bindung an das Protein zu verstärken, erfolgte die Inkubation bei einem pH-Wert von 9,5. Die kovalente Modifikation des Proteins wurde über ESI-MS Methoden überwacht. Anschließend wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie homogenisiert. Weiter konnte hierdurch der Überschuss des Liganden und die Überführung in den Kristallisationspuffer sichergestellt werden. Hierzu wurde die Lösung mit 1 mL/min auf eine mit Puffer äquilibrierte SEC-Säule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Cytiva) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min. Anschließend wurde die erforderliche Konzentration mittels eines Zentrifugalkonzentrators eingestellt.

Kristallisationspuffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP und 5 % Glycerin.

Proteinauftrennung über SDS PAGE

Zur Überprüfung der gesammelten Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde nach jedem Schritt eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierfür wurde ein 15%-iges Polyacrylamidgel verwendet. Es wurden 30 µL Probe mit 10 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Es wurden 10 μL dieser Proben und 3 μL Marker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 50 mA für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 10-20 min mit einer Färbelösung gefärbt und mit H_2O oder Entfärbelösung entfärbt.

SDS-Probenpuffer (4x): 100 mM Tris, 200 mM DTT, 1 M β -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0.2 % Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerol, pH 6.8.

Laufpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3.

Coomasie-Färbelösung: 0.3 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol.

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol.

Kristallisations-Screening

Initiale Screening-Experimente zur Proteinkristallisation wurden durchgeführt, wobei handelsübliche Kristallisationsbedingungen (JCSG Core I-IV, Qiagen; PACT Suite, Qiagen) verwendet wurden. Dazu wurden 70 μL Reservoirlösung in 96-well-Platten (96-well sitting drop iQ plates, TTP Labtech) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 nL Proteinlösung und 100 nL Reservoirlösung unter Verwendung eines Pipettierroboters (LCP-Mosquito, TTP Labtech) gemäß der *sitting-drop*-Methode. Die Platten wurden mit luftdichtem *Crystal Clear Sealing Tape* (Hampton Research) verschlossen und bei 20 °C im Kristallisationsplatten-Dokumentationssystem (ROCK IMAGER® 1000, Formulatrix) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Additiv-Screening

Zur Optimierung einiger Kristallisationsbedingungen wurden Additiv-Screens durchgeführt. Hierfür wurden 63 μL der zu optimierenden Kristallisationslösung (1,1-fache Konzentration der Stammlösung) in 96-well-Platten vorgelegt. Danach wurden 7 μL der Additive (Additive-Screen und Silver Bullet-Screen, Hampton Research) hinzugefügt. Anschließend wurden 100 nL der Proteinlösung pipettiert und mithilfe des Pipettierroboters Mosquito Crystal (TTP Labtech) mit 100 nL Reservoir-Lösung vermischt.

Nach dem Versiegeln der Platten wurden diese im Kristallisationsplatten-Imager (Rock Imager 3.8.3.1, Formulatrix) bei 4 °C oder 20 °C für 21 Tage inkubiert und regelmäßig visualisiert.

Kristallisations-Fine-Screening

Um vielversprechende Kristallisationsbedingungen weiter zu entwickeln, wurden *Fine-Screens* durchgeführt. Hierfür wurden 500 µL Reservoirlösung in einer 15-well-Platte (EasyXtal 15-well Tool X-Seal, NeXtal Biotechnologies) vorbereitet und gründlich gemischt. Anschließend wurden 1-2 µL Reservoirlösung zusammen mit 1-2 µL Proteinlösung auf einen Deckel gemäß der *hanging-drop*-Methode pipettiert. Der Deckel wurde dann luftdicht auf die entsprechende Kavität mit der Reservoirlösung aufgesetzt. Die Inkubation erfolgte bei Temperaturen zwischen 4 und 20 °C.

Röntgenanalyse

Für die Röntgenstrukturanalyse wurden, die zu untersuchenden Kristalle mit einer Nylon-Schleife (Mounted CryoLoop™, Hampton Research) aufgenommen und anschließend mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Diese wurden auf ihre Röntgenbeugung am hauseigenen Röntgendiffraktometer (D8 Venture, Bruker) getestet. Die Messung erfolgte bei 100 K im Stickstoffstrom mittels Kupfer-Bremsstrahlung ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) mit einer Belichtungszeit von 60-120 s. Die Diffraktion wurde durch einen Photon III Detektor aufgezeichnet. Falls Diffraktion gemessen werden konnte, wurde der Kristall in 0,5°-Schritten um 180° zwischen den Aufnahmen gedreht. Die Belichtungszeit betrug 120 s. Die Datensätze wurden mit XDS indiziert und mit XSCALE skaliert.¹⁷⁴ Die Kristallstruktur wurde durch molekularen Ersatz mit PHASER unter Verwendung einer bereits publizierten Struktur als Modell gelöst.¹⁷⁵ Die manuelle Modellierung der Struktur in der asymmetrischen Einheit wurde mit dem Programm COOT durchgeführt, und die Inhibitor-Topologie-Datei wurde mit Hilfe des des Programms elBOW generiert.¹⁷⁶ Für die Strukturverfeinerung wurde PHENIX.refine verwendet und anschließend mit dem PDB_REDO-Server optimiert.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Die finale Kristallstruktur wurde mit PyMOL visualisiert.

Biochemische und biophysikalische Methoden

Kovalente Proteinmodifikation und ESI-MS-Analyse

Der Nachweis von kovalenten Modifikationen an den unterschiedlichen KRAS-Proteinen erfolgte mittels UltiMate 3000 HPLC-System (ThermoFisher Scientific) gekoppelt mit einem VelosPro 2D-Ionenfalle-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific).

Für die kovalente Modifikation der KRAS-Proteine wurde 50 μM KRAS₁₋₁₆₉ mit einem zehnfachen Überschuss der Verbindungen inkubiert. Nach Inkubation bei RT oder 37 °C für die entsprechende Zeit wurden die Proben kurz zentrifugiert und die Modifikation des Proteins mittels ESI-MS kontrolliert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software Xcalibur™ sowie MagTran¹⁸⁰ analysiert. Die Quantifizierung der kovalenten Modifikation erfolgte mit dem Programm OriginPro 2023b.

Modifikationspuffer: 100 mM HEPES/ CHES, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 1 mM EDTA, 5% Glycerol; pH 7.5 - 9.5

Kompetitionsassay

Zur Bestimmung der kovalenten Modifikation von KRAS^{G13C}₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) mit dem acrylhaltigen Nukleotidanalogen (edaGDP) unter Konkurrenzbedingungen mit GDP und GTP zu analysieren, wurden vier verschiedene Bedingungen getestet. 5 μM KRAS^{G13C} (*Cys-light*) wurden (1) in Gegenwart von 36 μM edaGDP mit und ohne SOS, (2) in Gegenwart von 305 μM edaGDP, 36 μM GDP und 305 μM GTP mit und ohne SOS, (3) in Gegenwart von 36 μM edaGDP, 36 μM GDP und 305 μM GTP mit und ohne SOS und (4) 36 μM edaGDP, 360 μM GDP und 3050 μM GTP mit und ohne SOS inkubiert. Nach einer Inkubation von 1, 2, 3, 4, 5, 22 und 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die kovalente Proteinmodifikation mittels ESI-MS kontrolliert.

Modifikationspuffer: 100 mM CHES pH 9.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol

SOS-katalysierter Nukleotid-Austausch

Der SOS-katalysierte Nukleotidaustausch wurde bei 25 °C in einem FluoroMax®-4-Spektrofluorometer (Horiba) verfolgt. 5 µM KRAS₁₋₁₆₉ wurden mit 10 µM mantdGDP und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von SOS (0.25 µM und 0.5 µM) gemischt und nach Anregung bei 360 nm wurde die Emission bei 440 nm gemessen.

Nukleotidaustausch-Puffer: 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM TCEP.

On-Bead Verdau für MS/MS-Analysen

Die Detergenz-frei gewaschenen Beads wurden in 50 µl denaturierendem/reduzierendem Puffer aufgenommen und bei 350 rpm bei rt für 30 min inkubiert. Anschließend wurden den Proben 5,55 µl alkylierende Lösung hinzugeben und für weitere 30 min bei rt und bei 350 rpm inkubiert. Zu den Beads wurde 1 µl einer LysC/ Trypsin Lösung (0,5 mg/ml in rekonstitutierendem Puffer, Promega) hinzugeben und für 1 h bei 37 °C und 350 rpm geschüttelt. Daraufhin wurden der Überstand entfernt und die Beads in 165 µl 50 mM Tris (pH 7,5) aufgenommen und erneut 1 µl einer LysC/ Trypsin Lösung (0,5 mg/ml in rekonstitutierendem Puffer) dazugegeben und verdaut. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Beads entfernt und die Überstände vereinigt und für 24 h bei 37 °C und 350 rpm inkubiert. Der Verdau wurde mit 20 µl 10 %-iger TFA Lösung beendet und die Proteinproben für eine anschließende MS/MS Analyse über eine *stage-tip* Aufreinigung entsalzt.

Denaturierender/ reduzierender Puffer: 8 M urea, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT.

Alkylierender Puffer (10x): 50 mM Chloracetamid in denaturierendem/reduzierendem Puffer.

CovClick-Assay

Zur Durchführung des *CovClick*-Assays wurden 50 µM KRAS^{G12C}₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) mit einem 15-fachen Überschusses des Alkin-Fragments bei pH 9.5 und rt über Nacht kovalent modifiziert. Anschließend wurde der Ansatz über eine SEC gereinigt und aufkonzentriert.

Anschließend wurde der kovalente KRAS^{G12C}-Fragment Komplex mit einem 10-fachen Überschuss des jeweiligen Azides für 72 h bei 37 °C und pH 7.0 inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein LC-MS-Gefäß überführt und vermessen. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software Xcalibur™ sowie MagTran¹⁸⁰ analysiert.

Modifikationspuffer: 20 mM CHES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 9.5

CovClick-Puffer: 25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 %(v/v) Glycerol, pH 7.0

CovClick-Puffer (Kupfer-haltig): 25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 %(v/v) Glycerol, 0.5 mM Cu(II)SO₄, 0.5 mM Natriumascorbat, pH 7.0

Pulldown-basierte Experimente

GST-Pulldown

Zur Untersuchung der Effektorenbindung wurden 10 µg KRAS^{G13C}:GDP oder das kovalent modifizierte KRAS^{G13C}-**15a** und KRAS^{G13C}-**15b** sowie 20 µg GST-markiertes cRaf-RBD₅₁₋₁₃₁ mit/ohne 100 µM GppNHp und mit/ohne 1 µg SOS bei rt über Nacht inkubiert. Anschließend wurden jeder Probe 30 Minuten lang 50 µl Glutathion-Beads zugesetzt. Nach dem Waschen der Beads mit 500 µl Puffer wurden die Beads mit einem Magneten abgesetzt und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Die Perlen wurden in 50 µl 4xSDS-Proben Puffer resuspendiert, über eine SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und mit einer Coomassie-Färbungslösung versetzt.

Pulldown-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl and 2 mM MgCl₂.

Biotin-Pulldown

Für die MS/MS-basierte Proteom-Analyse wurden 500.000 PANC1 Zellen in einer 6-well-plate in insgesamt 2 ml Medium ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h mit den jeweiligen Bedingungen A - D inkubiert.

Bedingung A: DMSO (Kontrolle)

Bedingung B: 1 µM RL3822 (Biotin-Sondenmolekül; positive Kontrolle)

Bedingung C: 1 µM RI784 (Borussertib, kovalenter Akt-Inhibitor) und nach 4 h Inkubationszeit 1 µM RL3787 (Alkin-Sondenmolekül); negative Kontrolle

Bedingung D: 1 µM RL3787.

Nach Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden 500 µl Lysat mit dem Click-Mix sowie Biotin für 24 h bei 4 °C bei 350 rpm behandelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und das resultierende Zell-Pellet mehrmals mit eiskaltem MeOH behandelt. Das Pellet wurde in 1 % SDS im Ultraschallbad resuspendiert.

Die Proben wurden anschließend erneut über Nacht bei 4 °C und bei 350 rpm auf Streptavidin-Agarose Beads (Thermo Fisher Scientific, MyOne T1/C1, M270) inkubiert. Anschließend wurden die Beads mehrfach mit PBS Puffer gewaschen und konnten für nachfolgende Western Blot oder MS/MS Experimente verwendet werden.

Zellbiologische Methoden

Alle Zellbiologischen und die Verwendung von autoklavierten bzw. sterilen Medien, Puffern und Reagenzien erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank.

Verwendete Zelllinien

	Zelllinie	Mediumzusammensetzung	Quelle
KRAS	H358	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicilin-Streptomycin	AG Dehmelt, Dortmund
	H1355 (CRL-5865)	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicilin-Streptomycin	ATCC
	H1734 (CRL-5891)	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicilin-Streptomycin	ATCC
AKT2	PANC1	DMEM high glucose, GlutaMax, 10 % FBS Good, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicillin-Streptomycin	ATCC
	HCC1954	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicilin-Streptomycin	ATCC

Verwendete Antikörper

	Epitop	Produktnummer	Spezies	Hersteller
	β -Aktin	A5441	Maus	Sigma-Aldrich
Primärer Antikörper		4970	Kaninchen	CST
	tAKT	2938	Kaninchen	CST
	AKT2	3063	Kaninchen	CST
	pAKT	9018	Kaninchen	CST
	pAKT2	8599	Kaninchen	CST
	tERK	4696	Maus	CST
	pERK	4370	Kaninchen	CST
Sekundärer Antikörper	Anti-Maus IgG, DyLight 680 Conjugate	5470	Ziege	CST
	Anti-Hase IgG, DyLight 800 4X PEG Conjugate	5151	Ziege	CST

Zellkultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und feuchter Luftumgebung. Die Zelllinien wuchsen in Zellkulturflaschen mit Wachstumsoberflächen von 25, 75 und 175 cm² (T25, T75 und T175, Sarstedt). Alle zwei bis drei Tage wurde das Wachstumsmedium gewechselt. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 75 %, wurden sie subkultiviert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen.

Adhärente Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) und eine anschließende Inkubation von 5 Minuten bei 37 °C von der Flaschenoberfläche abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 8 ml Medium aufgenommen und die erhaltene Suspension bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 13 ml frischem Medium resuspendiert und zur erneuten Kultivierung mit einer Konfluenz von 10 % ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl und die Überprüfung der Viabilität erfolgten über eine Trypanblau-Färbung mithilfe des Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific).

Für alle zellulären Analysen wurden Zellen verwendet, die mindestens dreimal passagiert wurden und maximal acht Wochen in Kultur gehalten wurden.

Inkulturnahme von Säugerzellen

Für die Inkulturnahme von kryokonservierten Säugerzellen wurden diese in einem Wasserbad von 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 13 ml Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die Zellsuspension wurde durch Schwenken der Flasche gleichmäßig verteilt und bei 37 °C kultiviert.

Kryokonservierung von Säugerzellen

Für die langfristige Lagerung der Säugerzellen bei -150 ° wurden die Zellen mit einer 0,25 %-iger Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und nach der Zentrifugation das Zellpellet in 10 %-igen DMSO-enthaltenem Medium aufgenommen und mit einer Zelldichte von 1.000.000 Zellen pro ml in Kryogefäße überführt. Um eine möglichst langsame und schonende Gefrierung der Zellen zu erreichen, wurden diese zunächst in einem *Freezing Container* (Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C über Nacht gefroren und anschließend bei -150 °C gelagert.

CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay

Zur Untersuchung des Effekts von Inhibitoren auf die Zellviabilität wurde das Assay-Kit CellTiter-Glo (Promega) verwendet. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip, dass ATP als Indikator für metabolisch aktive Zellen genutzt werden kann. Hierbei wird ein Lumineszenzsignal gemessen, das das Produkt einer von dem Enzym Luciferase katalysierten Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin ist. Nach Zugabe des CTG-Reagenzes erfolgt eine Zellyse, und die Zellviabilität kann quantifiziert werden.

Zellzahlbestimmung

Zur Durchführung des Zellviabilitätsassays ist die Bestimmung der optimalen Zellzahl notwendig. Dazu werden die Zellen passagiert und anschließend Zellsuspensionen in der gewünschten Konzentration erstellt. Diese werden in Duplikaten mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser auf eine 384-well-Platte ausgesät und anschließend vier Tage bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % kultiviert. Anschließend wurde das CTG-Reagenz im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und nach 20 Minuten Inkubationszeit mit dem EnVision Manager ausgelesen. So wurde der lineare Wachstumsbereich der jeweiligen Zelllinie bestimmt und die optimale Zellzahl für den Assay ermittelt.

Viabilitäts-Assay (CTG)

Zur Durchführung des Zellviabilitätsassays war die Bestimmung der optimalen Zellzahl notwendig. Dazu wurden die Zellen passagiert und anschließend Zellsuspensionen in der gewünschten Konzentration erstellt. Diese wurden in Duplikaten mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser auf eine 384-Well-Platte ausgesät und anschließend vier Tage bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % kultiviert. Anschließend wurde das CTG-Reagenz im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und nach 20 Minuten Inkubationszeit mit dem EnVision Manager ausgelesen. So wurde der lineare Wachstumsbereich der jeweiligen Zelllinie bestimmt und die optimale Zellzahl für den Assay ermittelt.

Viabilitäts-Assay (SBR)

Der folgende Assay wurde von Yanosan Thavarasa und Dr. Thomas Mühlenberg des Universitätsklinikums Essen durchgeführt worden.

Der SBR-Assay dient der quantitativen Bestimmung des Zellproteingehalts durch Anfärbung mit SRB und anschließende photometrische Messung (SKEHAN *et al.*, 1990). Dazu wurden je nach Zelllinie festgelegte Zellzahlen in 96-well-Platten kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit ansteigenden Substanzkonzentrationen und eine 72-stündige Inkubation. Die Zellen wurden dann mit Trichloressigsäure fixiert, mit SRB gefärbt und nach Entfernung überschüssigen Farbstoffs mit einer TRIS-Lösung eluiert. Die Absorption des Farbstoffs bei 560 nm wurde gemessen und die Daten an der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) normalisiert. Dies erlaubte Rückschlüsse auf die Zellzahl, und die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt.

Generierung von Zell-Lysaten

Um Lysate von den jeweiligen Zelllinien zu gewinnen, wurden die Zellen passagiert und anschließend in einer gewünschten Konzentration in 2 ml Kultivierungsmedium in einer 6-well Platte ausgesät und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit den gewünschten Inhibitoren in unterschiedlichen finalen Konzentrationen behandelt für 24 h. Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen und wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml des Lysepuffers inkubiert und nach 20 min mit einem Zellscharber von der Oberfläche gelöst. Die Suspension wurde anschließend in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Der lösliche Überstand, welche die löslichen Proteine enthält, wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

Lysepuffer: 1 % Triton X-100 in PBS, Protease- und Phosphatase Inhibitoren Cocktail

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Für die Proteinkonzentration von den erhaltenen Lysaten wurde die Methode des Bicinchoninsäure- (BCA)-Assays genutzt. Hierzu wurde insgesamt 200 µl Puffer A und Puffer B des Pierce BCA Protein-Assay Kits in einem Verhältnis von (50:1) in eine 96-well-MicroPlatte mit 1 µl der Lysatprobe in Triplikaten pipettiert. Zur Erstellung der Referenzgrade wurde BSA ebenfalls in Triplikaten mit 1 µl, 2 µl und 3 µl verwendet und als Hintergrundsubstrat dient 1 µl des Lysepuffers in Triplikaten. Die Platte wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert, wobei ein Farbumschlag von grün nach lila beobachtet werden konnte. Das Auslesen der Absorption (280 nm) erfolgte mittels des EnVision Managers. Es konnte anschließend eine Regressionsgerade mit Hilfe der Referenzproteins BSA erstellt werden und anhand daran die Proteinkonzentration der Lysate errechnet werden.

Western Blotting

Im ersten Schritt des Western Blottings, erfolgte eine Auftrennung der Proteine der zuvor generierten Zelllysaten mittels SDS-PAGE. Hierbei wurden die Proben in einer Konzentration von 1 mg/ml in 4x SDS-Proben Puffer mit je 10 µg Protein in einem 12 %-igen SDS-Gel bei einer konstanten elektrischen Spannung von 30 mA für 1 h größen-spezifisch separiert. Anschließend wurden die Proteine von dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran vorher in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und anschließend zusammen mit einem Filterpapier in dem Transferpuffer äquilibriert. Um die Proteine auf die Membran zu transferieren, wurde die Membran und das Gel zwischen zwei Filterpapieren in die Elektroden der Pierce Power Blot Cassette eingespannt und das Programm Mixed Range MW (25-150 kDa) ausgewählt. Die Membran wurde anschließend in Wasser gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit dem LI-COR® Odyssey Blocking Buffer für eine Stunde bei rt blockiert. Danach wird die Membran erneut gewaschen (TBS-T Puffer, 3 x 5 min). Es erfolgt daraufhin die Bindung des primären Antikörpers, welcher in dem LI-COR® Odyssey Blocking Buffer verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde erneut gewaschen (TBS-T Puffer, 3 x 5 min) und für eine Stunde bei rt mit dem sekundären, mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper inkubiert.

Die Membran wurde erneut 3 x 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen und die Fluoreszenzsignale mit dem LI-COR® Odyssey CLx Imager detektiert. Die Auswertung und Quantifizierung der erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Image Studio *Light* durchgeführt.

Transferpuffer: 336 mM Tris, 260 mM Glycin, 140 mM Tricin, 2,5 mM EDTA

TBS-T-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7.4

Docking-Studien

Die Acrylamid-haltigen Liganden wurden mithilfe des Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94s) in einem ersten Vorbereitungsschritt energieminiert und anschließend mit LigandScout (v. 4.4.8) vorbereitet. KRAS^{G12D} (PDB 7RPZ) wurde mit Hilfe des Programms Coot zu der Variante KRAS^{G13C} manuell mutiert und anschließend über Protoss aufbereitet, welches im ProteinsPlus-Webserver implementiert ist. Das kovalente *Docking* erfolgte in GOLD mit 20 GA-Durchläufen, wobei die Option "early termination" deaktiviert wurde. Alle Nicht-Protein-Reste wurden entfernt, und die Bindungsstelle wurde basierend auf dem gebundenen Liganden und einem Radius von 7 Å definiert. Das Schwefelatom von Cys13 fungierte als Ankeratom des Proteins für die definierte Substruktur der vorbereiteten Liganden. Die Erkennung interner Wasserstoffbrücken wurde aktiviert, und das Umklappen von Amidbindungen und Ring-Ecken zugelassen. Abgesehen davon wurden die Standardeinstellungen verwendet. Die resultierenden Bindungsmodi wurden visuell geprüft und der Bindungsmodus mit den günstigsten Interaktionen für die weitere Analyse und Visualisierung ausgewählt. Hierzu wurde der Komplex in dem Programm PyMol visualisiert und zur weiteren Evaluierung *Pharmacophore*-Modelle in dem Programm LigandScout (v.4.4.8) generiert

Organische Synthesen

Alle Reagenzien, Lösungsmittel und trockenen Lösungsmittel wurden von den Firmen ABCR, Acros Organics, Activate Scientific, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Combi-Blocks, Honeywell, Maybridge, Merck, Roth, Sigma-Aldrich, TCI Chemicals und VWR bezogen und ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet. Um hydrolytische Spaltungsreaktionen zu vermeiden, wurden die für die Synthesen verwendeten Glasgeräte vorab mit einem Heißluftgebläse (Steinel HG 2220 E) ausgeheizt und anschließend mit Argon-Schutzgas gespült. Für Mikrowellen-gestützte Synthesen kamen die Mikrowellenreaktoren Monowave 300 und Monowave 400 der Firma Anton Paar zum Einsatz. Die Einwaage der Reagenzien erfolgte mithilfe einer Sartorius M-pact AX224 Analysewaage, während die Einwaage zur Herstellung von 10 mM Stammlösungen finaler Produkte mit einer Sartorius MSU125P-100-DI Feinwaage durchgeführt wurde. Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (TLC) überwacht. Hierfür wurden aluminiumbeschichtete Kieselgelplatten (Merck DC Kieselgel 60 F254) verwendet, deren Auswertung unter UV-Licht bei den Wellenlängen $\lambda = 254$ nm und 366 nm erfolgte. Zur Detektion von Aminen wurde nachträglich eine Ninhydrinlösung (1,5 g Ninhydrin, 100 ml n-BuOH, 3 ml AcOH) aufgetragen. Die TLC-gekoppelte Massenspektrometrie (TLC-MS) wurde unter Verwendung eines expressionL-CMS-Systems mit angeschlossenem Plate Express der Firma Advion durchgeführt. Die Reinigung der synthetisierten niedermolekularen Verbindungen erfolgte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (Partikelgröße 40–63 μm) der Firma VWR. Alternativ wurden die Verbindungen unter Verwendung eines Biotage Isolera One Systems gereinigt, bei dem Büchi Reveleris 12 g, 24 g und 40 g Kieselgel- (40 μm) oder 4 g, 12 g, 24 g und 40 g Octadecylsilan- (C18, 40 μm) Kartuschen zum Einsatz kamen. Zur Entfernung der Lösungsmittel wurde ein Rotationsverdampfer (Rotavapor R-210) der Firma Büchi verwendet. Syntheseprodukte in fester Form wurden entweder durch Schlenktechnik unter Hochvakuum (Vacuubrand Drehschieberpumpe RZ 6) oder mit einem Gefriertrockner (Christ Alpha 2-4 LD plus) getrocknet.

Die ^1H - und ^{13}C -Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) aller Verbindungen wurde an Bruker Avance DRX AV400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -NMR), AV500 (500 MHz für ^1H - und 125 MHz für ^{13}C -NMR), AV600 (600 MHz für ^1H -, 151 MHz für ^{13}C -NMR) sowie AV700 (700 MHz für ^1H - und 176 MHz für ^{13}C -NMR) Spektrometern durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren sind in *parts per million* (ppm) angegeben und beziehen sich auf das interne Standardsignal von DMSO- d_6 ($\delta = 2,50$ ppm für ^1H - und 39,51 ppm für ^{13}C -NMR). Die Abkürzungen für die Signalmultiplizitäten umfassen: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), tt (Triplet vom Triplet), q (Quartett), qd (Quartett vom Dublett), quint (Quintett), m (Multiplet), hept (Heptett), bs (breites Singulett). Die HPLC-MS-Analytik (ESI-MS) erfolgte unter Verwendung eines Agilent 1100 oder 1260 Series HPLC-Systems mit einer EC 125/4 Nucleodur C18 Gravity-Säule (3 μm) von Macherey-Nagel, gekoppelt an ein Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen-Massenspektrometer mit nachgeschaltetem ESA Corona Detektor oder ein Agilent MSD-iQ Massenspektrometer. Zusätzlich wurde ein Thermo Scientific LCQ Fleet System mit einer EC 50/2 Nucleodur C18 Gravity-Säule (1,8 μm) von Macherey-Nagel verwendet.

Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Entwicklung von neuen KRAS^{G12C} Inhibitoren mit Hilfe eines Fragment-basierten Ansatzes“

Darstellung von *Tert*-butyl 4-acryloylpiperazin-1-carboxylat (**8**)

Zu einer Lösung des Boc-geschützten Piperazins **7** (2 g, 10.7 mmol, 1 Äquiv.) in THF wurde die Base DIPEA (3.8 ml, 21.4 mmol, 2 Äquiv.) hinzugegeben und in einem Eisbad auf 0 °C heruntergekühlt. Anschließend wird vorsichtig das in THF verdünnte Acryloylchlorid (0.9 ml, 10.7 mmol, 1 Äquiv.) hinzuge tropft und die Lösung für 4 h gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit DCM/ bas. H₂O (3 x 50 ml) extrahiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (DCM/MeOH) lieferte das gewünschte Produkt **8** als gelbes Öl (2.4 g, 10.1 mmol, 94.2 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.52 (dd, J = 16.8, 10.6 Hz, 1H), 6.26 (dd, J = 16.8, 1.8 Hz, 1H), 5.68 (dd, 1H), 3.63 – 3.46 (m, 4H), 3.43 – 3.38 (m, 4H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.62, 154.60, 128.39, 127.31, 80.40, 45.66, 41.81, 28.42. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₁₂H₂₁N₂O₃: 241.1 [M+H]⁺, gefunden: 241.9.

Darstellung von 1-(Piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**9**)

Eine Lösung des Boc-geschützten Piperazins wird in DCM gelöst (3 Teile) und auf 0 °C heruntergekühlt. Anschließend wurde tropfenweise TFA (1 Teil) vorsichtig hinzugegeben und für 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit 10 M NaCl neutralisiert und das verbleibende Lösungsmittel entfernt und das Produkt **9** ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₇H₁₃N₂O: 141.1 [M+H]⁺, gefunden: 141.1.

Darstellung von 1-(4-(But-3-yn-1-yl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**5**)

Das entschützte Piperazin **9** (2.3 g, 12.4 mmol, 1 Äquiv.) wird in THF aufgenommen und mit der Base DIPEA (3.2 ml, 24.9 mmol, 2 Äquiv.) versetzt und in einem Eisbad auf 0 °C heruntergekühlt. Anschließend wird vorsichtig das in THF verdünnte 4-Bromobut-1-yn (1.6 ml, 12.4 mmol, 1 Äquiv.) hinzuge tropft und die Lösung für 6 h gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit DCM/ bas. H₂O (3 x 50 ml) extrahiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (DCM/MeOH) lieferte das gewünschte Produkt **5** als gelbes Öl (841.2 mg, 4.4 mmol, 35.1 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 6.79 (dd, J = 16.7, 10.4 Hz, 1H), 6.09 (dd, J = 16.7, 2.4 Hz, 1H), 5.67 (dd, J = 10.4, 2.4 Hz, 1H), 3.55 - 3.47 (m, 4H), 2.80 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.48 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.38 (dd, J = 8.7, 4.5 Hz, 4H), 2.32 (td, J = 7.4, 2.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.12, 128.19, 127.42, 83.13, 71.91, 56.23, 52.79, 52.03, 44.98, 41.38, 16.08. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$: 193.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 193.1.

Synthesevorschrift I

Der Alkin Baustein wurde in einem $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$ Gemisch (1:1) gelöst, mit katalytischen Mengen $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.007 eq), Natriumascorbat (0.07 eq) und entsprechendem Azid (1.3 eq) versetzt und für 3 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Anschließend wurde zusätzlich mit in einem Gemisch aus 10 % MeOH in DCM erneut extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte an Kieselgel (DCM/MeOH) und anschließend an C_{18} (ACN/ H_2O) und lieferte das gewünschte Produkt.

Darstellung von (S)-1-(4-(2-(1-(1-(4-Chlorophenyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**6a**)

Das Alkin Fragment **5** (50 mg, 0.2 mmol 1 Äquiv.) wurde mit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (61.4 mg, 0.3 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6a** (15.3 mg, 0.04 mmol, 15.7 %) als weißen Feststoff.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.11 (s, 1H), 7.46 - 7.42 (m, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 2H), 6.83 (dd, 1H), 6.18 (dd, J = 15.0, 3.9 Hz, 1H), 5.99 - 5.89 (m, 1H), 5.82 - 5.74 (m, J = 11.5, 5.7 Hz, 1H), 3.48 - 3.37 (m, 4H), 3.11 - 3.04 (m, 4H), 1.86 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 164.39, 158.55, 158.32, 142.21, 139.89, 132.76, 128.75, 128.43, 127.47, 121.69, 58.49, 54.44, 51.17, 50.73, 20.89, 20.12. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{ClN}_5\text{O}$: 374.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 374.3.

Das Signal bei 3.3 ppm ist dem Wasserpeak zuzuordnen. Mögliche Protonensignale in diesem Bereich könnten durch den Wasserpeak überlagert sein und sind daher nicht eindeutig sichtbar.

Darstellung von (S)-1-(4-(2-(1-(1-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**6b**)

Das Alkin Fragment **5** (20 mg, 0.1 mmol 1 Äquiv.) wurde mit CuSO₄·5H₂O, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (27.9 mg, 0.1 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6b** (5.8 mg, 0.01 mmol, 10 %) als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.06 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.82 - 6.76 (m, 1H), 6.10 (dd, J = 16.7, 2.4 Hz, 1H), 6.01 (dd, J = 7.1 Hz, 1H), 5.67 (dd, J = 10.4, 2.4 Hz, 1H), 3.56 - 3.48 (m, J = 10.8, 4.8 Hz, 4H), 2.79 (dd, J = 9.7, 5.7 Hz, 2H), 2.61 - 2.53 (m, 2H), 2.42 - 2.37 (m, J = 4.5 Hz, 4H), 1.88 (d, J = 7.1 Hz, 3H).
¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.12, 145.89, 145.25, 128.63, 128.21, 127.35, 127.22, 125.72, 125.20, 123.03, 121.35, 58.42, 57.10, 53.02, 52.24, 22.99, 20.90.
 HPLC-MS (m/z): Berechnet für C₂₀H₂₅F₃N₅O: 408.2 [M+H]⁺, gefunden: 408.2.

Darstellung von 1-(4-(2-(1-(2-(4-Chlorophenyl)-2,2-difluoroethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**6c**)

Das Alkin Fragment **5** (100 mg, 0.5 mmol 1 Äquiv.) wurde mit CuSO₄·5H₂O, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (146.7 mg, 0.7 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6c** (75.6 mg, 0.2 mmol, 35.5 %) als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.01 (s, 1H), 7.62 - 7.57 (m, J = 8.8 Hz, 4H), 6.84 (dd, 1H), 6.18 (dd, J = 16.7, 2.2 Hz, 1H), 5.77 (dd, J = 10.4, 2.2 Hz, 1H), 5.32 (t, 2H), 3.66 - 3.50 (m, J = 31.9, 25.0, 13.8 Hz, 2H), 3.47 - 3.41 (m, 1H), 3.34 - 3.22 (m, 2H), 3.15 - 3.09 (m, 1H), 3.14 - 3.09 (m, J = 16.5, 9.0 Hz, 2H), 3.04 - 2.96 (m, J = 22.2, 14.6 Hz, 1H).
¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 164.41, 142.32, 135.91, 132.17, 128.96, 128.57, 127.49, 127.40, 124.55, 119.04, 54.41, 51.16, 50.69, 19.96. HPLC-MS (m/z): Berechnet für C₁₉H₂₃ClF₂N₅O: 410.1 [M+H]⁺, gefunden: 410.0.

Das Signal bei 3.3 ppm ist dem Wasserpeak zuzuordnen. Mögliche Protonensignale in diesem Bereich könnten durch den Wasserpeak überlagert sein und sind daher nicht eindeutig sichtbar.

Darstellung von Methyl (Z)-3-(4-(2-(4-acryloylpiperazin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2,3-difluorophenyl)acrylat (**6d**)

Das Alkin Fragment **5** (50 mg, 0.3 mmol 1 Äquiv.) wurde mit CuSO₄*5H₂O, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (80.8 mg, 0.3 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6d** (19.7 mg, 0.04 mmol, 17.5 %) als weißen Feststoff.

¹H NMR (700 MHz, MeOD) δ 8.18 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.35 - 7.29 (m, J = 9.6, 1.3 Hz, 1H), 7.03 - 6.99 (m, 1H), 6.78 (dd, J = 16.8, 10.6 Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 7.6, 6.3 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 16.8, 1.8 Hz, 1H), 5.84 (dd, J = 10.6, 3.2 Hz, 1H), 3.60 - 3.56 (m, J = 14.8, 6.6 Hz, 2H), 3.33 - 3.28 (m, 4H). ¹³C NMR (176 MHz, MeOD) δ 167.50, 164.04, 144.06, 132.19, 130.09, 129.29, 127.88, 126.43, 126.03, 125.58, 123.00, 120.85, 56.75, 54.00, 52.80, 43.70, 21.33. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₂₁H₂₄F₂N₅O₃: 432.1 [M+H]⁺, gefunden: 431.9.

Das Signal bei 3.3 ppm ist dem Wasserpeak zuzuordnen. Mögliche Protonensignale in diesem Bereich könnten durch den Wasserpeak überlagert sein und sind daher nicht eindeutig sichtbar.

Darstellung von (S)-1-(4-(2-(1-(1-(3-Bromo-4-fluorophenyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**6e**)

Das Alkin Fragment **5** (24.9mg, 0.1 mmol 1 Äquiv.) wurde mit CuSO₄*5H₂O, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (41.0 mg, 0.2 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6e** (47.4 mg, 0.1 mmol, 70 %) als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.05 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 6.7, 2.0 Hz, 1H), 7.41 - 7.33 (m, 2H), 6.80 (dd, 1H), 6.10 (dd, J = 16.7, 2.4 Hz, 1H), 5.92 (dd, J = 7.1 Hz, 1H), 5.67 (dd, J = 10.4, 2.4 Hz, 1H), 3.57 - 3.45 (m, J = 11.1, 4.4 Hz, 4H), 2.81 - 2.74 (m, 2H), 2.65 - 2.54 (m, 2H), 2.45 - 2.35 (m, 4H), 1.86 (dd, J = 8.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.12, 145.24, 139.40, 131.58, 128.22, 128.05, 127.36, 121.12, 117.13, 116.95, 57.73, 57.05, 53.01, 52.25, 22.97, 20.93. HPLC-MS (m/z): Berechnet für C₁₉H₂₄BrFN₅O: 436.1 [M+H]⁺, gefunden: 436.0.

Darstellung von (S)-1-(4-(2-(1-(1-(4-Bromo-2-fluorophenyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl)prop-2-en-1-on (**6f**)

Das Alkin Fragment **5** (100 mg, 0.5 mmol 1 Äquiv.) wurde mit CuSO₄*5H₂O, Natriumascorbat sowie dem entsprechendem Azidbaustein (164.2 mg, 0.6 mmol, 1.3 Äquiv.) nach Synthesevorschrift 1 umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt **6f** (81.7 mg, 0.2 mmol, 36 %) als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.91 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 7.36 (m, J = 8.5, 4.5, 2.3 Hz, 1H), 7.22 (t, J = 10.7, 6.5 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 16.8, 10.7 Hz, 1H), 6.20 (dd, J = 16.8, 1.9 Hz, 1H), 5.89 (dd, J = 7.1 Hz, 1H), 5.77 - 5.73 (m, 1H), 3.69 - 3.54 (m, 4H), 2.96 - 2.87 (m, J = 13.2, 7.0 Hz, 2H), 2.74 - 2.68 (m, J = 7.3 Hz, 2H), 2.58 - 2.48 (m, 4H), 1.95 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 170.56, 167.42, 160.95, 159.31, 139.95, 132.98, 128.88, 128.80, 128.61, 117.95, 117.80, 60.36, 58.39, 46.72, 36.67, 23.92, 21.46. HPLC-MS (m/z): Berechnet für C₁₉H₂₄BrFN₅O: 436.3 [M+H]⁺, gefunden: 437.0.

Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Entwicklung von neuartigen Nukleotid-basierten Inhibitoren für die onkogene KRAS^{G13C}-Variante“¹⁸¹¹⁸

Synthesevorschrift II

Das Boc-geschützte Amin (1 Äquiv.) wird in THF gelöst und mit der Base DIPEA (2 Äquiv.) versetzt. Die Mischung wird in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird unter Vorsicht das in THF verdünnte Acryloylchlorid (1 Äquiv.) tropfenweise zugegeben, und die Lösung wird für 4 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Reaktionsgemisch dreimal mit DCM/basischem Wasser (3 x 50 ml) extrahiert, und das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Eine Lösung des Boc-geschützten Amins in DCM (3 Teile) wird hergestellt und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird TFA (1 Teil) tropfenweise zugegeben und die Mischung für 30 Minuten auf Eis gerührt. Danach wird die Lösung mit 10 M NaCl neutralisiert, und das restliche Lösungsmittel wird entfernt. Das gewünschte Produkt wird durch Säulenchromatographie über Kieselgel (DCM/MeOH + 1 % NH₃) isoliert.

Darstellung von *N*-(2-Aminoethyl)acrylamide (**12a**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *Tert*-butyl-(2-aminoethyl)carbammat (0.62 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12a** in einer Ausbeute von 73 mg (0.6 mmol, 91.3 %) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.49 (s, 1H), 6.26 - 6.19 (m, J = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.12 (dd, J = 17.1, 2.1 Hz, 1H), 5.63 (dd, J = 10.2, 2.1 Hz, 1H), 3.40 - 3.36 (m, J = 6.2 Hz, 2H), 2.92 - 2.87 (m, J = 12.1, 6.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 165.25, 131.51, 125.55, 38.47, 36.52. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₅H₁₁N₂O: 115.1 [M+H]⁺, gefunden: 114.8.

¹⁸ Die Auswertung der NMR-Spektren der in diesem Artikel beschriebenen Amine sowie die Aufnahme der HRMS-Spektren der finalen Verbindungen erfolgten durch Dr. Jonas Warmuth, AG Rauh und wurden bereits in der Publikation KIRSCHNER *et. al.* veröffentlicht.¹⁸¹

Darstellung von (R)-N-(Piperidin-3-yl)acrylamid (**12b**)

Gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift II wurden 100 mg *Tert*-butyl (*R*)-3-aminopiperidine-1-carboxylat (0.49 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12b** in einer Ausbeute von 61.3 mg (0.4 mmol, 81.1 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 6,77 (dd, J = 12,4, 16,4 Hz, 1 H), 6,22 (dd, J = 1,5, 16,8 Hz, 1 H), 5,78 (dd, J = 1,8, 10,6 Hz, 1 H), 4,30 (app d, J = 8,4 Hz, 1 H), 3,94-4,19 (m, 1 H), 3,84 (app d, J = 14,8 Hz, 1 H), 3,34-3,52 (m, 2 H), 2,05-2,19 (m, 1 H), 1,85 (app br. s, 1 H), 1,52-1,79 (m, 2 H).

Die ¹³C-NMR-Signale stimmten mit den Literaturdaten von Amin **12c** überein.

LC-MS (ESI-MS): [t_R] = 1,8 min, [M + H]⁺ berechnet für C₈H₁₅N₂O: 155,1; gefunden: 155,1.

Darstellung von (S)-N-(Piperidin-3-yl)acrylamid (**12c**)

Gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift II wurden 100 mg *Tert*-butyl (*S*)-3-aminopiperidine-1-carboxylat (0.49 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12c** in einer Ausbeute von 68.8 mg (0.4 mmol, 91.1 %) erhalten.

¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 6.77 (dd, J = 11.2, 15.9 Hz, 1 H), 6.22 (app d, J = 16.8 Hz, 1 H), 5.78 (app d, J = 10.5 Hz, 1 H), 4.31 (app br. s., 1 H), 4.07 (app br. s, 1 H), 3.84 (app d, J = 13.3 Hz, 1 H), 3.39 (app br. s., 1 H), 3.27 (app br. s., 1 H), 2.07-2.18 (m, 1 H), 1.85 (app br. s., 1 H), 1.67-1.76 (m, 1 H), 1.62 (app br. s., 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.3, 131.6, 127.7, 51.3, 50.5, 45.8, 31.0; LC-MS (ESI-MS): [t_R] = 1.4 min, [M + H]⁺ calcd. for C₈H₁₅N₂O: 155.1; found 155.1.

Darstellung von (R)-N-(Azepan-3-yl)acrylamid (**12d**)

Gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift II wurden 100 mg *Tert*-butyl (*R*)-3-aminoazepan-1-carboxylat (0.5 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12h** in einer Ausbeute von 62 mg (0.4 mmol, 78.5 %) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 6.26 (app s, 1 H), 6.25 (app d, J = 1.8 Hz, 1 H), 5.70 (dd, J = 5.1, 6.9 Hz, 1 H), 4.15 (app tt, J = 4.4, 9.1 Hz, 1 H), 3.40 (ddd, J = 0.7, 3.9, 13.6 Hz,

1 H), 3.35 (s, 1 H), 3.29 (app dd, $J = 4.6, 6.2$ Hz, 1 H), 3.18–3.23 (m, 2 H), 2.03–2.11 (m, 1 H), 1.95–2.02 (m, 1 H), 1.84–1.95 (m, 2 H), 1.73–1.81 (m, 1 H), 1.61–1.70 (m, 1 H); ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167.9, 131.7, 127.7, 50.5, 49.0, 48.5, 33.7, 26.3, 23.7; LC-MS (ESI-MS): [t_{R}] = 2 min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$: 169.1; found 169.1.

Darstellung von *N*-(2-Aminocyclohexyl)acrylamid (**12e**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *Tert*-butyl (2-aminocyclohexyl)carbammat (0.46 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12e** in einer Ausbeute von 32.8 mg (0.2 mmol, 42.4 %) erhalten. Das Diastereomerenverhältnis (dr) wurde mittels ^1H -NMR-Spektroskopie anhand der Integration der olefinischen Protonensignale bei $\delta = 5,63$ ppm und $\delta = 5,61$ ppm bestimmt und beträgt 9:10. Aufgrund der geringen Probenkonzentration sowie des Vorliegens eines diastereomeren Gemisches konnte keine verlässliche Reinheitsbestimmung mittels ^1H -NMR durchgeführt werden. Die Identitätsbestätigung erfolgte daher durch LC/MS-Analyse von Amin **12e** sowie durch HRMS-Messungen von **15e**, welche die Bildung eines Produkts mit dem erwarteten m/z -Verhältnis bestätigten. Aus diesem Grund sind die entsprechenden Spektren lediglich in den ergänzenden Informationen dargestellt; eine Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgt an dieser Stelle nicht. LC-MS (ESI-MS): [t_{R}] = 4,5 min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$: 169,1; gefunden: 169,1.

Darstellung von (*R*)-*N*-(Pyrrolidin-3-yl)acrylamid (**12f**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *tert*-Butyl (*R*)-3-aminopyrrolidin-1-carboxylat (0.53 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12f** in einer Ausbeute von 36 mg (0.3 mmol, 48.5 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 6.26 (app s, 1 H), 6.25 (app d, $J = 1.9$ Hz, 1 H), 5.70 (dd, $J = 5.0, 6.9$ Hz, 1 H), 4.48 (ddd, $J = 5.0, 7.0, 11.8$ Hz, 1 H), 3.54 (dd, $J = 6.9, 12.2$ Hz, 1 H), 3.48 (app td, $J = 7.6, 11.8$ Hz, 1 H), 3.38 (ddd, $J = 6.5, 8.2, 11.8$ Hz, 1 H), 3.27 (dd, $J = 4.7, 12.2$ Hz, 1 H), 2.34 (ddd, $J = 7.3, 14.0, 15.2$ Hz, 1 H), 2.06 (app ddt,

$J = 1.4, 6.8, 13.2$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ 168.5, 131.6, 127.7, 56.0, 51.3, 50.5, 45.7, 31.0; LC-MS (ESI-MS): $[t_{\text{R}}] = 1.6$ min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$: 141.1; found 141.1.

Darstellung von (S)-N-(Pyrrolidin-3-yl)acrylamid (**12g**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *tert*-Butyl (S)-3-aminopyrrolidin-1-carboxylat (0.53 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12g** in einer Ausbeute von 48 mg (0.3 mmol, 64.6 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 6.26 (app s, 1 H), 6.25 (app d, $J = 2.5$ Hz, 1 H), 5.70 (dd, $J = 4.7, 7.2$ Hz, 1 H), 4.48 (ddd, $J = 5.0, 7.2, 12.4$ Hz, 1 H), 3.54 (dd, $J = 6.9, 12.3$ Hz, 1 H), 3.48 (app td, $J = 7.6, 11.8$ Hz, 1 H), 3.37 (ddd, $J = 6.5, 8.2, 11.8$ Hz, 1 H), 3.26 (dd, $J = 4.7, 12.2$ Hz, 1 H), 2.34 (ddd, $J = 7.0, 14.0, 15.0$ Hz, 1 H), 2.06 (app ddt, $J = 1.2, 6.7, 13.3$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ 168.5, 131.6, 127.7, 55.8, 51.3, 50.5, 45.8, 31.0; LC-MS (ESI-MS): $[t_{\text{R}}] = 1.3$ min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$: 141.1; found 141.4.

Darstellung von N-(Piperidin-4-yl)acrylamid (**12h**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *tert*-Butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (0.5 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12h** in einer Ausbeute von 53.8 mg (0.3 mmol, 71.2 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.59 (br. s., 1 H), 8.42 (br. s., 1 H), 8.23 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 6.20 (dd, $J = 10.1, 17.1$ Hz, 1 H), 6.10 (dd, $J = 2.2, 17.0$ Hz, 1 H), 5.60 (dd, $J = 2.4, 10.0$ Hz, 1 H), 3.90 (dddd, $J = 3.6, 7.2, 7.4, 11.0$ Hz, 1 H), 3.26 (app d, $J = 13.0$ Hz, 2 H), 3.00 (app dd, $J = 10.8, 22.8$ Hz, 2 H), 1.92 (app dd, $J = 3.1, 13.8$ Hz, 2 H), 1.56 (ddd, $J = 3.8, 11.8, 24.4$ Hz, 2 H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.0, 131.5, 125.6, 43.4, 42.1, 28.2; LC-MS (ESI-MS): $[t_{\text{R}}] = 1.2$ min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$: 155.1; found 155.1.

Darstellung von 1-(4-Aminopiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**12i**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift II wurden 100 mg *tert*-Butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (0.5 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **12i** in einer Ausbeute von 61.3 mg (0.4 mmol, 80 %) erhalten.

^1H NMR (700 MHz, CD_3OD) δ 6.78 (dd, $J = 10.8, 16.8$ Hz, 1 H), 6.20 (dd, $J = 1.5, 16.9$ Hz, 1 H), 5.76 (dd, $J = 1.8, 10.7$ Hz, 1 H), 4.63 (app d, $J = 12.7$ Hz, 1 H), 4.21 (app d, $J = 13.6$ Hz, 1 H), 3.41 (app t, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 3.22 (tt, $J = 3.9, 12.6$ Hz, 1 H), 2.80 (app t, $J = 12.7$ Hz, 1 H), 2.09 (app t, $J = 13.3$ Hz, 2 H), 1.52 (app dt, $J = 11.3, 11.8$ Hz, 2 H); ^{13}C NMR (176 MHz, MeOD) δ 167.8, 129.0, 129.0, 56.0, 45.2, 41.6, 31.8, 30.9; LC-MS (ESI-MS): [t_{R}] = 1.2 min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$: 155.1; found 155.1.

Synthesevorschrift III

In 5 ml trockenem DMF wurde das Amin gelöst und langsam der Reaktionslösung zugegeben, welche bereits mit der Base DIPEA versetzt wurde. Das entstehende Präzipitat wurde bei 10.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend zweimal mit jeweils 30 ml trockenem DMF gewaschen, gefolgt von erneuter Zentrifugation. Abschließend wurde das Pellet in insgesamt 30 ml destilliertem Wasser gelöst. Die während der Reaktion gebildeten Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung direkt in der anschließenden Reaktion verwendet.

Synthesevorschrift IV

Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mittels einer 0.25 molaren HCl-Lösung auf 1.5 eingestellt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde der pH-Wert durch Zugabe einer 0.25 molaren NaOH-Lösung auf 7.5 angehoben, und die Nukleotidlösung wurde mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 ml verdünnt. Die Probe wurde mittels einer Spritzenfiltereinheit filtriert und anschließend über eine Q-Sepharose-Säule am FPLC-System gereinigt. Nach dem Auftragen der Nukleotidlösung auf die mit Puffer A (50 mM TEAB) äquilibrierte Säule wurde die Elution mit einer linearen Gradientenmischung von 0-100 % Puffer B (1 M TEAB) über 600 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die

gesammelten Fraktionen wurden per HPLC analysiert, wobei TBAB als Gegenion im Laufpuffer (50 mM KPi , pH 6.6, 10 mM TBAB, 16 % ACN; Säule: ProntoSIL® 120-5-C18-AQ, Bischoff) verwendet wurde. Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden kombiniert. Nach der Entfernung des Lösungsmittelgemisches mittels Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 10 ml ddH₂O gelöst und lyophilisiert.

Darstellung von (13)

Unter Verwendung eines stark sauren Kationenaustauschers (Ion Exchanger I von Merck) wurde das Nukleotid (GDP Na⁺-Salz, 300 mg, 0.6 mmol, 1 Äquiv.) zunächst in eine DMF-lösliche Form überführt. Hierzu wurde das vorgequollene Säulenmaterial in eine Säule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Packhöhe von 15 bis 20 cm gefüllt und anschließend für eine Stunde in einem Pyridin/Wasser-Gemisch (1:1) inkubiert.

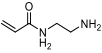
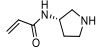
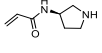
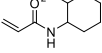
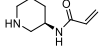
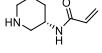
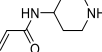
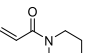
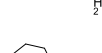
Nach dem Waschen des Säulenmaterials mit insgesamt 250 ml destilliertem Wasser wurde eine Lösung von 0.6 mmol des Nukleotids in einem Gesamtvolumen von 3 ml mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgebracht. Das Nukleotid wurde mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) in einen Rundkolben eluiert, der zuvor mit 1 ml Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA) vorgelegt worden war. Nach der Entfernung des Lösungsmittelgemisches mittels Rotationsverdampfer wurde der Rückstand dreimal mit jeweils 20 ml DMF behandelt und erneut eingeeengt. Der Rückstand wurde in insgesamt 20 ml DMF gelöst und nach der Zugabe von CDI (497.5 mg, 3.0 mmol, 5 Äquiv.) unter Argonatmosphäre wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei 0 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde diese durch Zugabe von 150 µl Methanol abgebrochen. Die in dieser Reaktion gebildeten Verbindungen wurden ohne weitere Aufreinigung direkt in der anschließenden Reaktion eingesetzt.

HPLC-MS (m/z): Berechnet für C₁₄H₁₄N₇O₁₁P₂: 518.0 [M-H], gefunden: 518.0.

Darstellung von (14a-i)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift III wurden die modifizierten Amine (1.2 mmol, 2 Äquiv.) unter Zugabe von DIPEA (0.5 ml, 3.0 mmol, 5 Äquiv.) mit GDP umgesetzt. Folgende Produkte konnten erhalten werden.

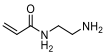
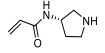
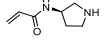
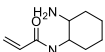
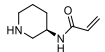
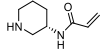
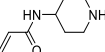
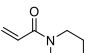
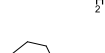
Tabelle 6. Übersicht der nach Synthesevorschrift III erhaltenen GDP-modifizierten Verbindungen und die vernommenen *m/z*.

Nukleotid	Linker	#	Exakte Masse	für [M-H] ⁻	HPLC-MS (<i>m/z</i>)
GDP		14a	678.1	C ₂₁ H ₃₀ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	677.9
		14f	730.1	C ₂₅ H ₃₄ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	729.9
		14g	730.1	C ₂₅ H ₃₄ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	730.1
		14e	786.2	C ₂₉ H ₄₂ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	786.1
		14b	758.2	C ₂₇ H ₃₈ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	758.1
		14c	758.2	C ₂₇ H ₃₈ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	758.1
		14h	758.2	C ₂₇ H ₃₈ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	758.1
		14i	758.2	C ₂₇ H ₃₈ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	758.0
		14d	786.2	C ₂₉ H ₄₂ N ₉ O ₁₃ P ₂ ⁻	786.1

Darstellung von (15a-i)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift IV wurden die Moleküle 14a-i umgesetzt. Folgende Produkte konnten erhalten werden.

Tabelle 7. Übersicht der nach Synthesevorschrift IV erhaltenen, finalen GDP-modifizierten Verbindungen und die vernommenen *m/z*.

Nukleotid	Linker	#	Exakte Masse	für [M-H] ⁻	LC-MS (<i>m/z</i>)	HRMS (<i>m/z</i>) [M + H] ⁺
		15a	582.0	C ₁₆ H ₂₂ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	581.9	
		15f	608.1	C ₁₈ H ₂₄ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	608.0	
		15g	608.1	C ₁₈ H ₂₄ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	608.0	
		15e	636.1	C ₂₀ H ₂₈ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	636.0	
GDP		15b	622.1069	C ₁₉ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	622.0	624,1220
		15c	622.1069	C ₁₉ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	622.1	624,1219
		15h	622.1	C ₁₉ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	622.0	
		15i	622.1	C ₁₉ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	622.0	
		15d	636.1226	C ₂₀ H ₂₈ N ₇ O ₁₃ P ₂ ⁻	636.0	638,1373

Synthetische Darstellung der Verbindung zu Kapitel „Kovalente Adressierung von KRAS^{G13C} mit niedermolekularen Verbindungen“

Allgemeine Synthesevorschrift V

2,4,7-trichloro-8-fluoropyrido[4,3-d]pyrimidin (1 Äquiv.) wird in THF gelöst und auf - 40 °C heruntergekühlt. Ein Boc-geschütztes Piperazin Derivat (1 Äquiv.) wird ebenfalls in THF gelöst und mit DIPEA (2 Äquiv.) versetzt und ebenfalls auf Eis vorgekühlt und tropfenweise zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach 30 min wurde eine vollständige Umsetzung der Startmaterial zum gewünschten Produkt detektiert (DC- und LC-MS-Kontrolle) und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Das an 4'-Position substituierte 2,7-dichloro-8-fluoropyrido[4,3-d]pyrimidin wurde anschließend in Dioxan gelöst und mit dem Alkohol (2-3 Äquiv.) und DIPEA (2 Äquiv.) versetzt, auf 80 °C erhitzt und für 16 h gerührt. Die Zugabe von ges. NaHCO₃ Lösung beendete die Reaktion. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl Lösung gewaschen sowie über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* evaporiert und eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (DCM/MeOH) lieferte das gewünschte Produkt als gelbes Öl.

Allgemeine Synthesevorschrift VI

Unter Argon Atmosphäre wurde das Pyrimidin Derivat (1 Äquiv.) und die entsprechende Boronsäure (2 Äquiv) in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan-Wasser (5:1) gelöst. Das Gemisch wurde für 10 min unter Argonstrom entgast und anschließend mit der Base Cs₂CO₃ (2 Äquiv.) sowie dem Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0.01 Äquiv.) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension für 16 h bei 80 °C gerührt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde zunächst über *Celite* gefiltert und das Filtrat mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet sowie das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (DCM/MeOH) lieferte das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift VII

Eine Lösung von dem Boc-geschützten Pyrimidin wird in DCM gelöst (3 Teile) und auf 0 °C heruntergekühlt. Anschließend wurde tropfenweise TFA (1 Teil) vorsichtig hinzugegeben. Und für 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit 10 M NaCl neutralisiert und das verbleibende Lösungsmittel entfernt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (DCM/MeOH + 1 % NH₃) lieferte das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift VIII

Das entschützte Amin wird in DCM gelöst und auf 0 °C heruntergekühlt und mit der Base DIPEA (3 Äquiv.) versetzt. Nach 30 min wird das ebenfalls in DCM vorgelöste Acryloylchlorid (1.1 Äquiv.) vorsichtig hinzugegeben und für weitere 16 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von einer ges. NaHCO₃ Lösung beendet und die wässrige Phase mit DCM extrahiert und einer ges. NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, *in vacuo* eingedunstet und säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH) gereinigt und lieferte das gewünschte Produkt.

Darstellung von Tert-butyl (S)-4-(7-chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-carboxylat (**23**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift V wurden 925 mg von **19** (3.7 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **23** in einer Ausbeute von 1.4 g (2.9 mmol, 74 %) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (s, 1H), 5.09 - 4.92 (m, *J* = 67.6, 8.4 Hz, 4H), 4.68 - 4.51 (m, 4H), 3.94 - 3.85 (m, 2H), 3.64 - 3.58 (m, 4H), 3.40 - 3.36 (m, 2H), 2.93 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.55, 163.39, 154.61, 147.59, 145.72, 143.63, 138.70, 118.47, 111.02, 80.87, 74.56, 66.22, 57.15, 44.85, 28.48, 24.71, 22.29, 21.03. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₂₂H₃₁ClFN₆O₃: 480.9 [M+H]⁺, gefunden: 481.0.

Darstellung von Tert-butyl (S)-4-(8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-carboxylat (**24**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VI wurden 1.4 g von **23** (2.9 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **24** in einer Ausbeute von 1.5 g (2.8 mmol, 91 %) erhalten.

¹H NMR (700 MHz, DMSO) δ 9.24 (s, 1H), 8.11 - 8.08 (m, *J* = 7.3, 3.6 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.70 - 7.66 (m, 3H), 7.60 - 7.57 (m, 2H), 7.53 - 7.49 (m, *J* = 8.1, 6.8, 1.2 Hz, 2H), 4.47 - 4.41 (m, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 2H), 4.28 - 4.23 (m, *J* = 10.6, 6.3 Hz, 2H), 4.05 - 4.00 (m, 5H), 3.65 - 3.58 (m, 5H), 2.40 (s, 4H), 1.99 - 1.92 (m, *J* = 20.8, 12.7, 6.2 Hz, 2H), 1.74 - 1.62 (m, 5H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (176 MHz, DMSO) δ 163.78, 163.58, 153.87, 149.20, 148.43, 148.37, 144.93, 144.15, 133.18, 132.26, 130.60, 129.45, 128.37, 128.01, 126.62, 110.75, 79.09, 69.40, 63.50, 56.92, 48.28, 45.55, 41.13, 28.37, 28.07, 22.54. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₃₂H₃₇FN₆O₃ [M+H]⁺ berechnet: 573.3 gefunden: 573.2.

Darstellung von (S)-8-Fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)-4-(piperazin-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin (**25**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VII wurden 1.53 g von **24** (2.6 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **25** in einer Ausbeute von 213.2 mg (0.45 mmol, 17 %) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.71 - 7.69 (m, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.61 - 7.57 (m, *J* = 8.1, 4.9, 1.5 Hz, 2H), 7.55 - 7.50 (m, 2H), 3.01 - 2.94 (m, *J* = 22.5 Hz, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.66 - 2.62 (m, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 2.37 - 2.35 (m, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 2.11 - 1.93 (m, 4H), 1.83 - 1.68 (m, 4H), 1.13 - 1.08 (m, 1H), 1.05 - 1.02 (m, *J* = 7.0 Hz, 1H), 0.88 - 0.80 (m, *J* = 12.1, 8.2, 5.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164.88, 162.96, 161.48, 154.48, 150.90, 145.18, 139.36, 135.07, 132.08, 127.79, 126.25, 121.17, 119.22, 117.28, 85.61, 70.94, 58.64, 57.47, 45.96, 36.96, 31.65, 23.56, 17.41. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₂₇H₃₀FN₆O: 472.5 [M+H]⁺, gefunden: 473.1.

Darstellung von *Tert*-butyl (*S*)-4-(4-(7-Chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-carbonyl)piperidin-1-carboxylat (**33c**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift V wurden 300 mg von **19** (1.1 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **33c** in einer Ausbeute von 113.3 mg (0.2 mmol, 16 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.21 (s, 1H), 4.62 - 4.48 (m, 3H), 4.26 - 4.18 (m, 4H), 4.17 - 4.09 (m, $J = 17.2$ Hz, 3H), 3.99 - 3.85 (m, $J = 36.9, 12.4, 7.6$ Hz, 4H), 3.17 - 3.11 (m, 1H), 2.90 - 2.82 (m, $J = 17.9$ Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.46 - 2.40 (m, $J = 9.0$ Hz, 1H), 2.17 - 2.10 (m, 1H), 1.88 - 1.84 (m, $J = 8.1, 5.0$ Hz, 2H), 1.81 - 1.74 (m, 3H), 1.67 - 1.60 (m, $J = 12.1, 8.6$ Hz, 2H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 175.96, 165.80, 165.54, 156.46, 152.75, 151.03, 146.22, 146.01, 81.17, 70.76, 65.71, 58.64, 57.55, 54.10, 45.49, 42.54, 42.03, 39.44, 29.44, 29.33, 28.68, 23.55. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{ClFN}_7\text{O}_4$: 591.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 591.7.

Darstellung von *Tert*-butyl (*S*)-4-(4-(8-Fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-carbonyl)piperidin-1-carboxylat (**34c**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VI wurden 113.3 mg von **33c** (0.19 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **34c** in einer Ausbeute von 101.5 mg (0.15 mmol, 78 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.22 (s, 1H), 8.06 (dt, $J = 6.7, 3.4$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.67 - 7.64 (m, 2H), 7.56 (t, 1H), 7.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.61 - 4.50 (m, 3H), 4.26 - 4.11 (m, 6H), 3.98 - 3.85 (m, $J = 35.2, 11.5, 6.8$ Hz, 3H), 3.16 - 3.12 (m, 1H), 2.99 - 2.72 (m, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.90 - 1.74 (m, 4H), 1.70 - 1.57 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 175.96, 165.80, 165.54, 156.46, 152.75, 151.03, 150.69, 150.61, 145.96, 135.21, 132.51, 130.98, 130.80, 129.59, 129.16, 127.77, 127.30, 126.28, 112.25, 81.17, 70.76, 65.71, 58.64, 45.49, 42.03, 39.44, 29.44, 29.33, 28.78, 28.71, 28.68, 23.57. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{FN}_7\text{O}_4$: 683.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 584.3.

Darstellung von (S)-4-(8-Fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)(piperidin-4-yl)methanon (35c)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VII wurden 101.5 mg von **34c** (0.15 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **35c** in einer Ausbeute von 87.5 mg (0.15 mmol, 100 %) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.32 (s, 1H), 8.13 - 8.10 (m, *J* = 8.6, 3.9 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.72 - 7.68 (m, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 3H), 7.61 - 7.58 (m, 1H), 7.54 - 7.51 (m, *J* = 8.2, 5.4, 1.1 Hz, 1H), 4.80 - 4.76 (m, *J* = 12.4, 3.6 Hz, 1H), 4.68 - 4.64 (m, *J* = 12.4, 6.7 Hz, 1H), 4.16 - 4.09 (m, 4H), 3.87 - 3.84 (m, 2H), 3.75 - 3.72 (m, *J* = 6.6, 3.4 Hz, 2H), 3.65 - 3.60 (m, 1H), 3.33 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 3.17 - 3.12 (m, 1H), 3.04 - 2.92 (m, 7H), 2.31 - 2.24 (m, *J* = 13.9, 8.5, 4.5 Hz, 1H), 2.12 - 2.03 (m, 1H), 1.96 - 1.88 (m, 2H), 1.86 - 1.81 (m, *J* = 13.6 Hz, 2H), 1.81 - 1.75 (m, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 173.27, 164.15, 154.34, 149.61, 145.52, 144.64, 133.71, 132.84, 131.10, 129.95, 128.87, 128.52, 127.12, 126.67, 125.84, 125.69, 111.28, 79.07, 63.88, 57.42, 41.66, 37.60, 28.95, 28.56, 27.56, 23.05, 22.96, 20.35, 19.75, 19.12, 14.64, 11.73. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet für C₃₃H₃₉FN₇O₂: 584.3 [M+H]⁺, gefunden: 583.8.

Darstellung von (S)-1-(4-(4-(8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-carbonyl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (26c)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VIII wurden 87.5 mg von **35c** (0.15 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **26c** in einer Ausbeute von 20.55 mg (0.03 mmol, 30.5 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.26 (s, 1H), 8.09 - 8.05 (m, 1H), 8.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.73 - 7.67 (m, J = 15.0, 5.5 Hz, 1H), 7.68 - 7.64 (m, 2H), 7.59 - 7.54 (m, 1H), 7.52 - 7.46 (m, J = 16.3, 9.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.21 (dd, 1H), 5.76 (dd, J = 10.7, 1.9 Hz, 1H), 4.82 - 4.75 (m, 1H), 4.69 - 4.63 (m, J = 15.6, 7.8 Hz, 1H), 4.62 - 4.57 (m, 2H), 4.27 - 4.14 (m, 4H), 4.03 - 3.84 (m, 4H), 3.55 - 3.48 (m, J = 6.4 Hz, 2H), 3.29 - 3.17 (m, 1H), 3.13 - 3.06 (m, J = 11.2, 3.7 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.36 - 2.28 (m, 1H), 2.15 - 1.93 (m, 2H), 1.91 - 1.83 (m, J = 13.0 Hz, 2H), 1.77 - 1.64 (m, J = 25.3, 10.7 Hz, 2H), 1.38 - 1.27 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 175.61, 167.59, 165.75, 165.13, 146.47, 146.12, 135.22, 133.36, 132.47, 131.07, 129.64, 129.19, 129.10, 128.43, 127.79, 127.33, 112.34, 67.92, 67.78, 58.39, 54.81, 45.43, 42.72, 42.55, 39.30, 30.11, 29.34, 28.13, 23.48. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{FN}_7\text{O}_3$: 638.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 638.4.

Darstellung von *tert*-Butyl (*S*)-(2-(4-(7-chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)ethyl)carbamat (**33b**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift V wurden 300 mg von **19** (1.2 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **33b** in einer Ausbeute von 425.9 mg (0.8 mmol, 68 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.15 (s, 1H), 4.58 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.15 (t, 4H), 3.51 - 3.45 (m, J = 6.9 Hz, 2H), 3.28 - 3.21 (m, 1H), 3.11 - 3.03 (m, J = 21.3 Hz, 1H), 2.74 (t, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.64 - 2.61 (m, J = 6.6 Hz, 1H), 2.24 - 2.16 (m, J = 12.8, 8.1 Hz, 2H), 2.02 - 1.79 (m, 4H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.23, 151.02, 145.95, 135.19, 132.49, 132.05, 131.09, 71.65, 69.79, 66.35, 58.53, 57.91, 50.30, 43.64, 41.87, 37.53, 34.54, 30.77, 28.96, 23.52. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{ClFN}_7\text{O}_3$: 524.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 525.4.

Darstellung von (S)-2-(4-(7-Chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)ethan-1-amin (**34b**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VII wurden 425.9 mg von **34c** (0.15 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **34b** in einer Ausbeute von 43,7 mg (0.1 mmol, 69%) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.15 (s, 1H), 4.57 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.16 - 4.13 (m, 4H), 3.50 - 3.47 (m, J = 6.6 Hz, 2H), 3.32 (t, J = 3.1, 1.6 Hz, 4H), 3.27 - 3.22 (m, 1H), 3.10 - 3.03 (m, 1H), 2.76 - 2.71 (m, J = 12.9, 8.0 Hz, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.23 - 2.14 (m, J = 12.8, 8.1 Hz, 1H), 1.95 - 1.89 (m, 1H), 1.87 - 1.80 (m, J = 20.4, 7.3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.23, 165.63, 165.50, 152.74, 150.72, 145.91, 112.10, 69.79, 66.35, 58.53, 57.91, 50.30, 41.87, 37.53, 30.75, 28.96, 23.52. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{ClFN}_7\text{O}$: 424.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 423.1.

Darstellung von (S)-N-(2-(4-(7-Chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)ethyl)acrylamid (**34c**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VIII wurden 43,7 mg von **34b** (0.1 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **34c** in einer Ausbeute von 161.1 mg (0.33 mmol, 31 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.15 (s, 1H), 6.31 - 6.26 (m, 1H), 6.24 (dd, J = 17.1, 2.3 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 9.7, 2.3 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.16 - 4.12 (m, 5H), 3.48 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.27 - 3.21 (m, 1H), 3.08 - 3.02 (m, J = 23.0 Hz, 1H), 2.76 - 2.73 (m, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.62 - 2.57 (m, 2H), 2.23 - 2.16 (m, J = 11.9, 7.6 Hz, 1H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.88 - 1.81 (m, J = 20.4, 7.3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.23, 165.63, 165.50, 152.74, 150.72, 145.91, 112.10, 69.79, 66.35, 58.53, 57.91, 50.30, 41.87, 37.53, 30.75, 28.96, 23.52. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{ClFN}_7\text{O}_2$: 478.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 477.4.

Darstellung von (S)-N-(2-(4-(8-Fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)ethyl)acrylamid (**26c**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VI wurden 116.1 mg von **34c** (0.33 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **26c** in einer Ausbeute von 95.6 mg (0.17 mmol, 50.8 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.15 (s, 1H), 8.08 - 8.03 (m, 1H), 8.00 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.67 - 7.62 (m, 2H), 7.55 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 11.2, 4.1 Hz, 1H), 6.31 - 6.26 (m, 1H), 6.24 (dd, J = 17.1, 2.3 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 9.7, 2.3 Hz, 1H), 4.59 - 4.55 (m, J = 5.5 Hz, 2H), 4.17 - 4.12 (m, 4H), 3.51 - 3.44 (m, J = 6.9 Hz, 2H), 3.33 - 3.30 (m, J = 3.1, 1.5 Hz, 2H), 3.27 - 3.22 (m, 1H), 3.10 - 3.03 (m, 1H), 2.76 - 2.72 (m, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.64 - 2.60 (m, J = 13.2, 6.6 Hz, 2H), 2.19 (mq, J = 12.8, 8.1 Hz, 1H), 1.95 - 1.88 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.23, 165.63, 165.50, 152.74, 146.20, 145.91, 135.19, 132.49, 132.05, 130.97, 129.58, 129.16, 127.77, 127.29, 126.71, 126.27, 112.10, 69.79, 66.35, 58.53, 57.91, 54.02, 50.30, 41.87, 37.53, 28.96, 23.52. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{FN}_7\text{O}_2$: 570.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 570.3.

Darstellung von *Tert*-butyl (*S*)-1'-(7-chloro-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-[4,4'-bipiperidin]-1-carboxylat (**33d**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift V wurden 500 mg von **19** (1.9 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **33d** in einer Ausbeute von 608 mg (1.1 mmol, 55 %) erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.36 (s, 1H), 4.95 - 4.62 (m, J = 44.7 Hz, 4H), 4.11 - 3.86 (m, J = 56.5 Hz, 2H), 3.87 - 3.71 (m, J = 6.6 Hz, 1H), 3.54 - 3.37 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 3.01 - 2.90 (m, 2H), 2.72 - 2.57 (m, 1H), 2.41 - 2.20 (m, J = 38.7 Hz, 2H), 2.19 - 1.90 (m, J = 45.0 Hz, 4H), 1.90 - 1.76 (m, J = 16.1, 9.4 Hz, 2H), 1.67 - 1.38 (m, J = 44.4 Hz, 4H), 1.31 - 1.16 (m, 3H), 1.01 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.53, 162.25, 160.47, 160.10, 153.79, 141.21, 138.51, 96.32, 67.62, 66.71, 59.78, 57.61, 43.00, 41.67, 40.64, 40.37, 29.19, 28.00, 27.20, 22.28. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{ClFN}_6\text{O}_3$: 563.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 564.1.

Darstellung von *Tert*-butyl (*S*)-1'-(8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-[4,4'-bipiperidin]-1-carboxylat (**34d**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VI wurden 608 mg von **34c** (1.1 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **34d** in einer Ausbeute von 562.1 mg (0.85 mmol, 79.5 %) erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.36 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.73 - 7.60 (m, $J = 17.1, 9.5$ Hz, 3H), 7.59 - 7.47 (m, $J = 16.9, 9.1$ Hz, 2H), 4.95 - 4.67 (m, $J = 44.7$ Hz, 4H), 4.10 - 3.69 (m, $J = 80.2, 31.6$ Hz, 4H), 3.53 - 3.32 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 3.01 - 2.84 (m, 2H), 2.70 - 2.55 (m, 1H), 2.41 - 2.23 (m, $J = 38.7$ Hz, 2H), 2.20 - 1.98 (m, $J = 35.1$ Hz, 4H), 1.89 - 1.77 (m, 2H), 1.66 - 1.39 (m, $J = 44.4$ Hz, 3H), 1.30 - 1.17 (m, 3H), 1.00 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.53, 165.41, 162.92, 162.25, 161.34, 160.86, 160.58, 160.47, 160.10, 158.95, 154.44, 153.79, 151.26, 150.32, 148.36, 147.58, 89.75, 80.92, 79.62, 66.71, 57.61, 41.67, 40.64, 40.33, 29.63, 29.58, 28.10, 27.21, 22.28. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{FN}_6\text{O}_3$: 655.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 655.4.

Darstellung von (S)-4-([4,4'-Bipiperidin]-1-yl)-8-fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin (**35d**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VII wurden 562.1 mg von **34d** (0.85 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **35d** in einer Ausbeute von 472.3 mg (0.85 mmol, 100 %) erhalten.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.21 (s, 1H), 8.13 - 8.04 (m, $J = 12.2, 4.4$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.70 - 7.65 (m, $J = 8.7, 4.3$ Hz, 2H), 7.62 - 7.56 (m, 1H), 7.55 - 7.49 (m, $J = 8.2, 6.9, 1.3$ Hz, 1H), 4.80 - 4.71 (m, $J = 14.1, 7.1$ Hz, 1H), 4.69 - 4.59 (m, 3H), 3.88 - 3.76 (m, 1H), 3.67 - 3.55 (m, 1H), 3.41 - 3.27 (m, $J = 24.5, 12.2$ Hz, 4H), 2.97 (d, $J = 4.3$ Hz, 3H), 2.92 - 2.76 (m, 3H), 2.33 - 2.21 (m, 1H), 2.14 - 2.01 (m, $J = 12.9, 6.6$ Hz, 1H), 1.94 - 1.82 (m, 6H), 1.46 - 1.33 (m, $J = 21.0, 10.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.55, 158.20, 157.85, 133.25, 130.59, 129.58, 128.45, 128.09, 126.70, 126.24, 125.39, 120.33, 117.42, 114.50, 114.48, 114.35, 66.60, 64.72, 56.40, 49.20, 43.45, 37.77, 28.72, 26.33, 25.67, 25.41, 21.83. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{FN}_6\text{O}$: 555.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 555.1.

Darstellung von (S)-1-(1'-(8-Fluoro-2-((1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)-[4,4'-bipiperidin]-1-yl)prop-2-en-1-on (**26d**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VIII wurden 472.3 mg von **35d** (0.85 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **26d** in einer Ausbeute von 14.2 mg (0.02 mmol, 18.9 %) erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.36 (s, 1H), 8.01 (dd, $J = 37.3, 8.0$ Hz, 2H), 7.74 - 7.60 (m, $J = 17.1, 9.5$ Hz, 3H), 7.59 - 7.47 (m, $J = 16.9, 9.1$ Hz, 2H), 6.57 (dd, $J = 16.9, 10.7$ Hz, 1H), 6.31 - 6.21 (m, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.80 - 5.69 (m, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.95 - 4.65 (m, $J = 44.7$ Hz, 4H), 4.10 - 3.85 (m, $J = 56.5$ Hz, 2H), 3.83 - 3.71 (m, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.55 - 3.39 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 3.02 - 2.87 (m, 2H), 2.73 - 2.56 (m, 1H), 2.43 - 2.20 (m, $J = 38.7$ Hz, 2H), 2.19 - 1.93 (m, $J = 35.1$ Hz, 4H), 1.93 - 1.75 (m, $J = 16.1, 9.4$ Hz, 2H), 1.66 - 1.38 (m, $J = 44.4$ Hz, 4H), 1.35 - 1.15 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.53, 162.25, 160.47, 160.10, 154.44, 135.49, 133.80, 131.56, 130.70, 129.17, 127.56, 127.35, 126.72, 125.36, 114.10, 80.38, 72.96, 67.60, 66.71, 41.67, 40.64, 40.33, 29.58, 27.21, 26.55, 22.28. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{FN}_6\text{O}_2$: 609.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 609.3.

Darstellung von Tert-butyl 3-(4-(7-chloro-8-fluoro-2-(((S)-1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**33e**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift V wurden 300 mg von **19** (1.2 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **33e** in einer Ausbeute von 632.4 mg (1.2 mmol, 99 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.01 (s, 1H), 4.23 - 3.98 (m, $J = 43.3, 37.9$ Hz, 4H), 3.94 - 3.70 (m, 1H), 3.68 - 3.53 (m, 2H), 3.51 - 3.35 (m, 1H), 3.29 - 3.16 (m, 4H), 3.15 - 3.09 (m, $J = 14.9, 9.4$ Hz, 2H), 3.09 - 3.02 (m, 4H), 2.96 (s, 3H), 2.41 - 2.22 (m, 1H), 2.21 - 2.14 (m, 1H), 2.13 - 2.08 (m, $J = 15.2, 7.5$ Hz, 2H), 2.06 - 1.92 (m, 2H), 1.34 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.01, 164.95, 161.93, 155.19, 148.64, 147.77, 144.97, 92.67, 77.80, 71.71, 57.85, 55.29, 52.76, 44.00, 38.33, 32.18, 31.24, 29.60, 28.00, 25.80, 23.69. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{ClFN}_7\text{O}_3$: 551.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 551.8.

Darstellung von Tert-butyl 3-(4-(8-fluoro-2-(((S)-1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**34e**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VI wurden 632.4 mg von **33e** (1.2 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **34e** in einer Ausbeute von 589.2 mg (0.91 mmol, 73.1%) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.01 (s, 1H), 8.09 – 8.06 (m, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 – 7.98 (m, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 3H), 7.59 – 7.55 (m, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 1H), 4.21 – 4.05 (m, 3H), 3.88 (d, J = 23.5 Hz, 1H), 3.79 – 3.72 (m, 1H), 3.67 – 3.53 (m, 1H), 3.53 – 3.36 (m, 2H), 3.29 – 3.17 (m, 3H), 3.15 – 3.08 (m, 4H), 3.09 – 3.05 (m, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.25 – 2.15 (m, 2H), 2.13 – 2.08 (m, J = 15.2, 7.5 Hz, 2H), 2.06 – 1.92 (m, 2H), 1.34 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167.11, 165.04, 162.04, 157.99, 155.25, 148.58, 145.01, 135.15, 131.17, 129.62, 129.02, 127.89, 127.38, 126.27, 126.02, 92.67, 82.40, 77.80, 57.42, 55.29, 52.76, 44.00, 38.33, 34.00, 31.28, 30.53, 28.05, 25.14, 23.69. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{FN}_7\text{O}_3$: 641.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 641.8.

Darstellung von 8-Fluoro-2-(((S)-1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)-4-(4-(pyrrolidin-3-yl)piperazin-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin (**35e**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VII wurden 589.2 mg von **34e** (0.91 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **35e** in einer Ausbeute von 289 mg (0.53 mmol, 58.6 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.01 (s, 1H), 8.14 – 7.97 (m, 2H), 7.72 – 7.61 (m, 3H), 7.60 – 7.54 (m, J = 21.4, 7.6 Hz, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 1H), 4.33 – 4.17 (m, J = 47.4 Hz, 2H), 4.07 – 4.02 (m, J = 21.4 Hz, 1H), 4.01 – 3.92 (m, 1H), 3.91 – 3.74 (m, 2H), 3.74 – 3.54 (m, 3H), 3.55 – 3.40 (m, J = 14.3, 11.3, 9.5, 5.3 Hz, 2H), 3.39 – 3.31 (m, 2H), 3.27 – 3.18 (m, 4H), 3.18 – 3.09 (m, J = 20.1, 14.8, 8.6 Hz, 1H), 3.08 – 3.04 (m, J = 7.7 Hz, 1H), 2.95 (s, 3H), 2.83 – 2.71 (m, 1H), 2.53 – 2.25 (m, 2H), 2.23 – 2.07 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 166.98, 162.48, 162.00, 158.85, 151.71, 150.88, 135.13, 131.59, 131.38, 129.59, 129.09, 128.02, 127.42, 126.33, 126.02, 91.80, 79.17, 64.13, 59.82, 57.95, 52.34, 45.77, 44.75, 28.83, 28.05, 27.05, 23.19. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{FN}_7\text{O}$: 541.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 541.3.

Darstellung von 1-(3-(4-(8-Fluoro-2-(((S)-1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy)-7-(naphthalen-1-yl)pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)pyrrolidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**26e**)

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift VIII wurden 289 mg von **35e** (0.53 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **26e** in einer Ausbeute von 24.8 mg (0.04 mmol, 6.5 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.26 (s, 1H), 8.07 (dd, 1H), 8.01 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 7.68 - 7.61 (m, 2H), 7.56 (t, 1H), 7.49 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.66 (dd, $J = 12.2, 6.4$ Hz, 1H), 4.62 - 4.54 (m, $J = 29.3$ Hz, 3H), 4.30 - 4.14 (m, 5H), 4.01 - 3.84 (m, 4H), 3.56 - 3.47 (m, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.13 - 3.05 (m, $J = 11.2, 3.7$ Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.35 - 2.29 (m, $J = 14.0, 6.9$ Hz, 1H), 2.13 - 1.92 (m, 3H), 1.88 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H), 1.77 - 1.61 (m, 2H), 1.39 - 1.28 (m, $J = 28.6, 23.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 175.61, 167.58, 165.75, 165.11, 162.97, 131.07, 129.10, 128.43, 127.79, 127.33, 126.29, 112.34, 67.79, 58.39, 54.81, 50.26, 46.43, 45.43, 42.55, 39.30, 29.34, 28.13, 23.48. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{FN}_7\text{O}_2$: 596.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 596.3.

Darstellung von 1-(4-((1*R*,5*S*)-3-(7-(8-Ethynyl-7-fluoro-3-hydroxynaphthalen-1-yl)-8-fluoro-2-(((2*R*,7*aS*)-2-fluorotetrahydro-1*H*-pyrrolizin-7*a*(5*H*)-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-8-carbonyl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**36**)

Zu einer Lösung der Carbonsäure 1-Acryloylpiperidin-4-Carbonsäure (164.8 mg, 0.09 mmol, 3 Äquiv.) in DCM/DMF wurde die Base DIPEA (16.6 μl , 0.09 mmol, 3 Äquiv.) hinzugegeben. Nach vollständigem Lösen, wurde dem Gemisch HATU (34.2 mg, 0.09 mmol, 3 Äquiv.) bei 0°C beigefügt und für 15 min gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Amins 4-(4-((1*R*,5*S*)-3,8-Diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)-8-fluoro-2-(((2*R*,7*aS*)-2-fluorotetrahydro-1*H*-pyrrolizin-7*a*(5*H*)-yl)methoxy)pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-7-yl)-5-ethynyl-6-fluoronaphthalen-2-ol (MRTX1133 (**2**)) (20 mg, 0.03 mmol, 1 Äquiv.). Die Reaktion wurde bis zum vollständigen Umsatz des Aktivesters bei rt gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Rohprodukt zwischen Bicarbonat und Wasser getrennt und anschließend die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Anschließende säulenchromatographische Aufreinigung lieferte das gewünschte Produkt (**36**) (2,9 mg, 0.003 mmol, 12,6 %) als gelben Feststoff.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.34 (s, 1H), 8.25 - 8.18 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.49 - 7.41 (m, 1H), 7.08 (sm, 1H), 6.62 - 6.52 (m, $J = 16.8, 10.5$ Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 16.5$ Hz, 1H), 5.79 - 5.72 (m, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.46 (dd, $J = 51.8$ Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 4.05 - 4.00 (m, $J = 11.6$ Hz, 2H), 3.62 - 3.57 (m, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.52 - 3.45 (m, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.37 - 3.26 (m, 1H), 3.22 (sm, 2H), 2.71 - 2.58 (m, 4H), 2.39 - 2.26 (m, $J = 15.2, 7.8$ Hz, 2H), 2.22 - 2.08 (m, 2H), 1.70 - 1.59 (m, $J = 7.3$ Hz, 5H), 1.59 - 1.51 (m, 2H), 1.51 - 1.41 (m, 3H), 1.40 - 1.32 (m, $J = 16.1$ Hz, 2H), 1.31 - 1.27 (m, 2H), 0.90 - 0.85 (m, $J = 14.4, 7.3$ Hz, 4H), 0.85 - 0.81 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 180.19, 170.53, 169.97, 169.38, 167.48, 165.76, 164.41, 150.40, 148.72, 144.85, 142.56, 136.45, 131.62, 125.79, 124.98, 91.46, 89.36, 86.72, 84.79, 83.32, 81.58, 71.36, 63.25, 57.23, 54.83, 50.68, 45.39, 45.11, 39.18, 37.53, 29.85, 27.14, 24.50, 20.24. HPLC-MS (m/z): Berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_4$: 766.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 766.3.

Literaturverzeichnis

1. Organization, W. H. *Global Health Estimates 2020: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region* **2020**, 2000-2019.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, 100, 57-70.
3. Hanahan, D.; Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144, 646-674.
4. Nguyen, D.; Gocke, C. D. Managing the genomic revolution in cancer diagnostics. *Virchows Archiv* **2017**, 471, 175-194.
5. Mendelsohn, J. Personalizing Oncology: Perspectives and Prospects. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31, 1904-1911.
6. Chen, Daniel S.; Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **2013**, 39, 1-10.
7. Przepiorka, D.; Ko, C.-W.; Deisseroth, A.; Yancey, C. L.; Candau-Chacon, R.; Chiu, H.-J.; Gehrke, B. J.; Gomez-Broughton, C.; Kane, R. C.; Kirshner, S.; Mehrotra, N.; Ricks, T. K.; Schmiel, D.; Song, P.; Zhao, P.; Zhou, Q.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. FDA Approval: Blinatumomab. *Clin Cancer Res* **2015**, 21, 4035-4039.
8. Seyhan, A. A.; Carini, C. Are innovation and new technologies in precision medicine paving a new era in patients centric care? *Journal of Translational Medicine* **2019**, 17, 114.
9. Watson, J. D. The Human Genome Project: Past, Present, and Future. *Science* **1990**, 248, 44-49.
10. Schwartzberg, L.; Kim, E. S.; Liu, D.; Schrag, D. Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* **2017**, 160-169.
11. Bode, A. M.; Dong, Z. Recent advances in precision oncology research. *npj Precision Oncology* **2018**, 2, 11.
12. Dolly, S. O.; Collins, D. C.; Sundar, R.; Popat, S.; Yap, T. A. Advances in the Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Drugs* **2017**, 77, 813-827.

13. Barot, S.; Patel, H.; Yadav, A.; Ban, I. Recent advancement in targeted therapy and role of emerging technologies to treat cancer. *Medical Oncology* **2023**, 40, 324.
14. Weinstein, I. B. Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science* **2002**, 297, 63-64.
15. Sharma, S. V.; Fischbach, M. A.; Haber, D. A.; Settleman, J. "Oncogenic Shock": Explaining Oncogene Addiction through Differential Signal Attenuation. *Clinical Cancer Research* **2006**, 12, 4392s-4395s.
16. Hoelder, S.; Clarke, P. A.; Workman, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology* **2012**, 6, 155-176.
17. Druker Brian, J.; Talpaz, M.; Resta Debra, J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford John, M.; Lydon Nicholas, B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers Charles, L. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 344, 1031-1037.
18. Iqbal, N.; Iqbal, N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice* **2014**, 2014, 357027.
19. Kantarjian, H.; O'Brien, S.; Jabbour, E.; Garcia-Manero, G.; Quintas-Cardama, A.; Shan, J.; Rios, M. B.; Ravandi, F.; Faderl, S.; Kadia, T.; Borthakur, G.; Huang, X.; Champlin, R.; Talpaz, M.; Cortes, J. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* **2012**, 119, 1981-1987.
20. Mok Tony, S.; Wu, Y.-L.; Ahn, M.-J.; Garassino Marina, C.; Kim Hye, R.; Ramalingam Suresh, S.; Shepherd Frances, A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen Willemijn, S. M. E.; Lee Chee, K.; Sebastian, M.; Templeton, A.; Mann, H.; Marotti, M.; Ghiorghiu, S.; Papadimitrakopoulou Vassiliki, A. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 376, 629-640.
21. Chevallier, M.; Tsantoulis, P.; Addeo, A.; Friedlaender, A. Influence of Concurrent Mutations on Overall Survival in EGFR-mutated Non-small Cell Lung Cancer.

22. Wu, J.; Zhang, M.; Liu, D. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *Journal of Hematology & Oncology* **2016**, *9*, 21.
23. Herman, S. E. M.; Montraveta, A.; Niemann, C. U.; Mora-Jensen, H.; Gulrajani, M.; Krantz, F.; Mantel, R.; Smith, L. L.; McClanahan, F.; Harrington, B. K.; Colomer, D.; Covey, T.; Byrd, J. C.; Izumi, R.; Kaptein, A.; Ulrich, R.; Johnson, A. J.; Lannutti, B. J.; Wiestner, A.; Woyach, J. A. The Bruton Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor Acalabrutinib Demonstrates Potent On-Target Effects and Efficacy in Two Mouse Models of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research* **2017**, *23*, 2831-2841.
24. Yu, H. A.; Arcila, M. E.; Rekhtman, N.; Sima, C. S.; Zakowski, M. F.; Pao, W.; Kris, M. G.; Miller, V. A.; Ladanyi, M.; Riely, G. J. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19*, 2240-2247.
25. Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; Joensuu, H.; Roberts, P. J.; Eisenberg, B. L.; von Mehren, M.; Fletcher, C. D. M.; Sandau, K.; McDougall, K.; Ou, W.-b.; Chen, C.-J.; Fletcher, J. A. Molecular Correlates of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, *24*, 4764-4774.
26. Lategahn, J.; Keul, M.; Rauh, D. Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 2307-2313.
27. Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmüller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* **1997**, *277*, 333-339.
28. Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13*, 828-851.
29. Wennerberg, K.; Rossman, K. L.; Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **2005**, *118*, 843-846.
30. Cox, A. D.; Der, C. J. Ras history. *Small GTPases* **2010**, *1*, 2-27.
31. Hobbs, G. A.; Der, C. J.; Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science* **2016**, *129*, 1287-1292.

32. Harvey, J. J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **1964**, 204, 1104-1105.
33. Kirsten, W. H.; Mayer, L. A. Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1967**, 39, 311-335.
34. Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Suard, Y.; Perucho, M.; Li, Y.; Kamata, T.; Feramisco, J.; Stavnezer, E.; Fogh, J.; Wigler, M. H. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1983**, 80, 2112-2116.
35. Valencia, A.; Chardin, P.; Wittinghofer, A.; Sander, C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **1991**, 30, 4637-4648.
36. Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **1991**, 349, 117-127.
37. Saraste, M.; Sibbald, P. R.; Wittinghofer, A. The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **1990**, 15, 430-434.
38. Milburn, M. V.; Tong, L.; deVos, A. M.; Brünger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S.-H. Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins. *Science* **1990**, 247, 939-945.
39. Herrmann, C. Ras-effector interactions: after one decade. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, 13, 122-129.
40. Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **2001**, 294, 1299-1304.
41. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **2003**, 3, 11-22.
42. Bos, J. L.; Rehmann, H.; Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **2007**, 129, 865-877.
43. van Hattum, H.; Waldmann, H. Chemical Biology Tools for Regulating RAS Signaling Complexity in Space and Time. *Chemistry & Biology* **2014**, 21, 1185-1195.

44. Mendelsohn, J.; Baselga, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **2000**, *19*, 6550-6565.
45. Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice* **2012**, *2012*, 743193.
46. Cutts, B. A.; Sjogren, A.-K. M.; Andersson, K. M. E.; Wahlstrom, A. M.; Karlsson, C.; Swolin, B.; Bergo, M. O. Nf1 deficiency cooperates with oncogenic K-RAS to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood* **2009**, *114*, 3629-3632.
47. Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949-954.
48. Smalley, K. S. M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International Journal of Cancer* **2003**, *104*, 527-532.
49. Ocana, A.; Vera-Badillo, F.; Al-Mubarak, M.; Templeton, A. J.; Corrales-Sanchez, V.; Diez-Gonzalez, L.; Cuenca-Lopez, M. D.; Seruga, B.; Pandiella, A.; Amir, E. Activation of the PI3K/mTOR/AKT Pathway and Survival in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e95219.
50. Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E.; Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* **2011**, *11*, 761-774.
51. Thaimattam, R.; Banerjee, R.; Miglani, R.; Iqbal, J. Protein Kinase Inhibitors: Structural Insights Into Selectivity. *Current Pharmaceutical Design* **2007**, *13*, 2751-2765.
52. Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1994**, *140*, 1-22.

53. Goody, R. S.; Frech, M.; Wittinghofer, A. Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts. *Trends in Biochemical Sciences* **1991**, *16*, 327-328.
54. Lim, S. M.; Westover, K. D.; Ficarro, S. B.; Harrison, R. A.; Choi, H. G.; Pacold, M. E.; Carrasco, M.; Hunter, J.; Kim, N. D.; Xie, T.; Sim, T.; Jänne, P. A.; Meyerson, M.; Marto, J. A.; Engen, J. R.; Gray, N. S. Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 199-204.
55. Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A.; Hoffmann, M.; Hahn, S. A.; Triola, G.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I. H.; Waldmann, H. Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **2013**, *497*, 638-642.
56. Papke, B.; Murarka, S.; Vogel, H. A.; Martín-Gago, P.; Kovacevic, M.; Truxius, D. C.; Fansa, E. K.; Ismail, S.; Zimmermann, G.; Heinelt, K.; Schultz-Fademrecht, C.; Al Saabi, A.; Baumann, M.; Nussbaumer, P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I. H. Identification of pyrazolopyridazinones as PDE δ inhibitors. In *Nat Commun*, 2016; Vol. 7, p 11360.
57. Martín-Gago, P.; Fansa, E. K.; Klein, C. H.; Murarka, S.; Janning, P.; Schürmann, M.; Metz, M.; Ismail, S.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Bastiaens, P. I. H.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. A PDE δ -KRas Inhibitor Chemotype with up to Seven H-Bonds and Picomolar Affinity that Prevents Efficient Inhibitor Release by Arl2. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 2423-2428.
58. Hofmann, M. H.; Lu, H.; Duenzinger, U.; Gerlach, D.; Trapani, F.; Machado, A. A.; Daniele, J. R.; Waizenegger, I.; Gmachl, M.; Rudolph, D.; Vellano, C. P.; Marotti, M.; Vucenovic, V.; Heffernan, T. P.; Marszalek, J. R.; Petronczki, M. P.; Kraut, N. Abstract CT210: Trial in Process: Phase 1 studies of BI 1701963, a SOS1::KRAS Inhibitor, in combination with MEK inhibitors, irreversible KRASG12C inhibitors or irinotecan. *Cancer Research* **2021**, *81*, CT210-CT210.
59. Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **2013**, *503*, 548-551.

60. Ferguson, F. M.; Gray, N. S. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery* **2018**, *17*, 353-377.
61. Chaikuad, A.; Koch, P.; Laufer, S. A.; Knapp, S. The Cysteine of Protein Kinases as a Target in Drug Development. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 4372-4385.
62. Burstein, H. J.; Sun, Y.; Dirix, L. Y.; Jiang, Z.; Paridaens, R.; Tan, A. R.; Awada, A.; Ranade, A.; Jiao, S.; Schwartz, G.; Abbas, R.; Powell, C.; Turnbull, K.; Vermette, J.; Zacharchuk, C.; Badwe, R. Neratinib, an Irreversible ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced ErbB2-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 1301-1307.
63. Jänne, P. A.; Yang, J. C.-H.; Kim, D.-W.; Planchard, D.; Ohe, Y.; Ramalingam, S. S.; Ahn, M.-J.; Kim, S.-W.; Su, W.-C.; Horn, L.; Haggstrom, D.; Felip, E.; Kim, J.-H.; Frewer, P.; Cantarini, M.; Brown, K. H.; Dickinson, P. A.; Ghiorghiu, S.; Ranson, M. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 1689-1699.
64. Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *10*, 307-317.
65. Lonsdale, R.; Ward, R. A. Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 3816-3830.
66. Barf, T.; Kaptein, A. Irreversible Protein Kinase Inhibitors: Balancing the Benefits and Risks. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 6243-6262.
67. Canon, J.; Rex, K.; Saiki, A. Y.; Mohr, C.; Cooke, K.; Bagal, D.; Gaida, K.; Holt, T.; Knutson, C. G.; Koppada, N.; Lanman, B. A.; Werner, J.; Rapaport, A. S.; San Miguel, T.; Ortiz, R.; Osgood, T.; Sun, J.-R.; Zhu, X.; McCarter, J. D.; Volak, L. P.; Houk, B. E.; Fakih, M. G.; O'Neil, B. H.; Price, T. J.; Falchook, G. S.; Desai, J.; Kuo, J.; Govindan, R.; Hong, D. S.; Ouyang, W.; Henary, H.; Arvedson, T.; Cee, V. J.; Lipford, J. R. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* **2019**, *575*, 217-223.
68. Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Baer, B. R.; Blake, J. F.; Bouhana, K.; Briere, D. M.; Brown, K. D.; Burgess, L. E.; Burns, A. C.; Burkard, M. R.; Chiang, H.; Chicarelli, M. J.; Cook, A. W.; Gaudino, J. J.; Hallin, J.; Hanson, L.; Hartley, D. P.; Hicken, E. J.; Hingorani, G. P.; Hinklin, R. J.; Mejia, M. J.; Olson, P.; Otten, J. N.; Rhodes, S. P.; Rodriguez, M. E.; Savechenkov, P.; Smith, D. J.; Sudhakar, N.; Sullivan, F. X.; Tang,

- T. P.; Vigers, G. P.; Wollenberg, L.; Christensen, J. G.; Marx, M. A. Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRASG12C Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 6679-6693.
69. Hallin, J.; Engstrom, L. D.; Hargis, L.; Calinisan, A.; Aranda, R.; Briere, D. M.; Sudhakar, N.; Bowcut, V.; Baer, B. R.; Ballard, J. A.; Burkard, M. R.; Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Vigers, G. P.; Xue, Y.; Gatto, S.; Fernandez-Banet, J.; Pavlicek, A.; Velastagui, K.; Chao, R. C.; Barton, J.; Pierobon, M.; Baldelli, E.; Patricoin, E. F., III; Cassidy, D. P.; Marx, M. A.; Rybkin, I. I.; Johnson, M. L.; Ou, S.-H. I.; Lito, P.; Papadopoulos, K. P.; Jänne, P. A.; Olson, P.; Christensen, J. G. The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discovery* **2020**, *10*, 54-71.
70. Goebel, L.; Müller, M. P.; Goody, R. S.; Rauh, D. KRasG12C inhibitors in clinical trials: a short historical perspective. *RSC Medicinal Chemistry* **2020**, *11*, 760-770.
71. Kirschner, T.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting KRAS Diversity: Covalent Modulation of G12X and Beyond in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, *67*, 6044-6051.
72. Karachaliou, N.; Mayo, C.; Costa, C.; Magrí, I.; Gimenez-Capitan, A.; Molina-Vila, M. A.; Rosell, R. KRAS Mutations in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* **2013**, *14*, 205-214.
73. Neumann, J.; Zeindl-Eberhart, E.; Kirchner, T.; Jung, A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice* **2009**, *205*, 858-862.
74. Zheng, Q.; Peacock, D. M.; Shokat, K. M. Drugging the Next Undruggable KRAS Allele-Gly12Asp. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *65*, 3119-3122.
75. Luo, J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Seminars in Oncology* **2021**, *48*, 10-18.
76. Li, S.; Balmain, A.; Counter, C. M. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nature Reviews Cancer* **2018**, *18*, 767-777.
77. Hansen, R.; Peters, U.; Babbar, A.; Chen, Y.; Feng, J.; Janes, M. R.; Li, L.-S.; Ren, P.; Liu, Y.; Zarrinkar, P. P. The reactivity-driven biochemical mechanism of covalent KRAS^{G12C} inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* **2018**, *25*, 454-462.

78. Wang, X.; Allen, S.; Blake, J. F.; Bowcut, V.; Briere, D. M.; Calinisan, A.; Dahlke, J. R.; Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Gunn, R. J.; Hallin, J.; Laguer, J.; Lawson, J. D.; Medwid, J.; Newhouse, B.; Nguyen, P.; O'Leary, J. M.; Olson, P.; Pajk, S.; Rahbaek, L.; Rodriguez, M.; Smith, C. R.; Tang, T. P.; Thomas, N. C.; Vanderpool, D.; Vigers, G. P.; Christensen, J. G.; Marx, M. A. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65, 3123-3133.
79. Yu, Z.; He, X.; Wang, R.; Xu, X.; Zhang, Z.; Ding, K.; Zhang, Z.-M.; Tan, Y.; Li, Z. Simultaneous Covalent Modification of K-Ras(G12D) and K-Ras(G12C) with Tunable Oxirane Electrophiles. *Journal of the American Chemical Society* **2023**, 145, 20403-20411.
80. Zhang, Z.; Guiley, K. Z.; Shokat, K. M. Chemical acylation of an acquired serine suppresses oncogenic signaling of K-Ras(G12S). *Nature Chemical Biology* **2022**, 18, 1177-1183.
81. Zhang, Z.; Morstein, J.; Ecker, A. K.; Guiley, K. Z.; Shokat, K. M. Chemoselective Covalent Modification of K-Ras(G12R) with a Small Molecule Electrophile. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, 144, 15916-15921.
82. Zheng, Q.; Zhang, Z.; Guiley, K. Z.; Shokat, K. M. Strain-release alkylation of Asp12 enables mutant selective targeting of K-Ras-G12D. *Nature Chemical Biology* **2024**.
83. Awad Mark, M.; Liu, S.; Rybkin Igor, I.; Arbour Kathryn, C.; Dilly, J.; Zhu Viola, W.; Johnson Melissa, L.; Heist Rebecca, S.; Patil, T.; Riely Gregory, J.; Jacobson Joseph, O.; Yang, X.; Persky Nicole, S.; Root David, E.; Lowder Kristen, E.; Feng, H.; Zhang Shannon, S.; Haigis Kevin, M.; Hung Yin, P.; Sholl Lynette, M.; Wolpin Brian, M.; Wiese, J.; Christiansen, J.; Lee, J.; Schrock Alexa, B.; Lim Lee, P.; Garg, K.; Li, M.; Engstrom Lars, D.; Waters, L.; Lawson, J. D.; Olson, P.; Lito, P.; Ou Sai-Hong, I.; Christensen James, G.; Jänne Pasi, A.; Aguirre Andrew, J. Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition in Cancer. *New England Journal of Medicine* **2021**, 384, 2382-2393.
84. Kim, D.; Herdeis, L.; Rudolph, D.; Zhao, Y.; Böttcher, J.; Vides, A.; Ayala-Santos, C. I.; Pourfarjam, Y.; Cuevas-Navarro, A.; Xue, J. Y.; Mantoulidis, A.; Bröker, J.; Wunberg, T.; Schaaf, O.; Popow, J.; Wolkerstorfer, B.; Kropatsch, K. G.; Qu, R.; de Stanchina, E.; Sang, B.; Li, C.; McConnell, D. B.; Kraut, N.; Lito, P. Pan-KRAS

- inhibitor disables oncogenic signalling and tumour growth. *Nature* **2023**, 619, 160-166.
85. Fumagalli, G.; Carbajo, R. J.; Nissink, J. W. M.; Tart, J.; Dou, R.; Thomas, A. P.; Spring, D. R. Targeting a Novel KRAS Binding Site: Application of One-Component Stapling of Small (5-6-mer) Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 64, 17287-17303.
86. Garrigou, M.; Sauvagnat, B.; Duggal, R.; Boo, N.; Gopal, P.; Johnston, J. M.; Partridge, A.; Sawyer, T.; Biswas, K.; Boyer, N. Accelerated Identification of Cell Active KRAS Inhibitory Macrocyclic Peptides using Mixture Libraries and Automated Ligand Identification System (ALIS) Technology. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65, 8961-8974.
87. Tanada, M.; Tamiya, M.; Matsuo, A.; Chiyoda, A.; Takano, K.; Ito, T.; Irie, M.; Kotake, T.; Takeyama, R.; Kawada, H.; Hayashi, R.; Ishikawa, S.; Nomura, K.; Furuichi, N.; Morita, Y.; Kage, M.; Hashimoto, S.; Nii, K.; Sase, H.; Ohara, K.; Ohta, A.; Kuramoto, S.; Nishimura, Y.; Iikura, H.; Shiraishi, T. Development of Orally Bioavailable Peptides Targeting an Intracellular Protein: From a Hit to a Clinical KRAS Inhibitor. *Journal of the American Chemical Society* **2023**, 145, 16610-16620.
88. Zhang, Z.; Shokat, K. M. Bifunctional Small-Molecule Ligands of K-Ras Induce Its Association with Immunophilin Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, 58, 16314-16319.
89. Schulze, C. J.; Seamon, K. J.; Zhao, Y.; Yang, Y. C.; Cregg, J.; Kim, D.; Tomlinson, A.; Choy, T. J.; Wang, Z.; Sang, B.; Pourfarjam, Y.; Lucas, J.; Cuevas-Navarro, A.; Ayala-Santos, C.; Vides, A.; Li, C.; Marquez, A.; Zhong, M.; Vemulapalli, V.; Weller, C.; Gould, A.; Whalen, D. M.; Salvador, A.; Milin, A.; Saldajeno-Concar, M.; Dinglasan, N.; Chen, A.; Evans, J.; Knox, J. E.; Koltun, E. S.; Singh, M.; Nichols, R.; Wildes, D.; Gill, A. L.; Smith, J. A. M.; Lito, P. Chemical remodeling of a cellular chaperone to target the active state of mutant KRAS. *Science* **2023**, 381, 794-799.
90. Bond, M. J.; Chu, L.; Nalawansa, D. A.; Li, K.; Crews, C. M. Targeted Degradation of Oncogenic KRASG12C by VHL-Recruiting PROTACs. *ACS Central Science* **2020**, 6, 1367-1375.
91. Li, L.; Wu, Y.; Yang, Z.; Xu, C.; Zhao, H.; Liu, J.; Chen, J.; Chen, J. Discovery of KRas G12C-IN-3 and Pomalidomide-based PROTACs as degraders of

- endogenous KRAS G12C with potent anticancer activity. *Bioorganic Chemistry* **2021**, 117, 105447.
92. Zeng, M.; Xiong, Y.; Safaee, N.; Nowak, R. P.; Donovan, K. A.; Yuan, C. J.; Nabet, B.; Gero, T. W.; Feru, F.; Li, L.; Gondi, S.; Ombelets, L. J.; Quan, C.; Jänne, P. A.; Kostic, M.; Scott, D. A.; Westover, K. D.; Fischer, E. S.; Gray, N. S. Exploring Targeted Degradation Strategy for Oncogenic KRASG12C. *Cell Chemical Biology* **2020**, 27, 19-31.e6.
93. Yang, F.; Wen, Y.; Wang, C.; Zhou, Y.; Zhou, Y.; Zhang, Z.-M.; Liu, T.; Lu, X. Efficient targeted oncogenic KRAS^{G12C} degradation via first reversible-covalent PROTAC. *Eur J Med Chem* **2022**, 230, 114088.
94. Nagashima, T.; Inamura, K.; Nishizono, Y.; Suzuki, A.; Tanaka, H.; Yoshinari, T.; Yamanaka, Y. ASP3082, a First-in-class novel KRAS G12D degrader, exhibits remarkable anti-tumor activity in KRAS G12D mutated cancer models. *European Journal of Cancer* **2022**, 174, S30.
95. Escher, T. E.; Satchell, K. J. F. RAS degraders: The new frontier for RAS-driven cancers. *Molecular Therapy* **2023**, 31, 1904-1919.
96. Gehrtz, P.; Marom, S.; Bührmann, M.; Hardick, J.; Kleinbölting, S.; Shraga, A.; Dubiella, C.; Gabizon, R.; Wiese, J. N.; Müller, M. P.; Cohen, G.; Babaev, I.; Shurrush, K.; Avram, L.; Resnick, E.; Barr, H.; Rauh, D.; London, N. Optimization of Covalent MKK7 Inhibitors via Crude Nanomole-Scale Libraries. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65, 10341-10356.
97. Goebel, L.; Kirschner, T.; Koska, S.; Rai, A.; Janning, P.; Maffini, S.; Vatheuer, H.; Czodrowski, P.; Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting oncogenic KRasG13C with nucleotide-based covalent inhibitors. *eLife* **2023**, 12, e82184.
98. Janes, M. R.; Zhang, J.; Li, L.-S.; Hansen, R.; Peters, U.; Guo, X.; Chen, Y.; Babbar, A.; Firdaus, S. J.; Darjania, L.; Feng, J.; Chen, J. H.; Li, S.; Li, S.; Long, Y. O.; Thach, C.; Liu, Y.; Zariéh, A.; Ely, T.; Kucharski, J. M.; Kessler, L. V.; Wu, T.; Yu, K.; Wang, Y.; Yao, Y.; Deng, X.; Zarrinkar, P. P.; Brehmer, D.; Dhanak, D.; Lorenzi, M. V.; Hu-Lowe, D.; Patricelli, M. P.; Ren, P.; Liu, Y. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* **2018**, 172, 578-589.e17.
99. Huisgen, R. In *Proceedings of the Chemical Society. October 1961*, Proc. Chem. Soc, 1961; 1961.

100. Giese, B.; González-Gómez, J. A.; Witzel, T. The Scope of Radical CC-Coupling by the "Tin Method". *Angewandte Chemie International Edition in English* **1984**, 23, 69-70.
101. Heck, R. F.; Nolley Jr, J. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *The Journal of organic chemistry* **1972**, 37, 2320-2322.
102. Buitrago Santanilla, A.; Regalado, E. L.; Pereira, T.; Shevlin, M.; Bateman, K.; Campeau, L.-C.; Schneeweis, J.; Berritt, S.; Shi, Z.-C.; Nantermet, P.; Liu, Y.; Helmy, R.; Welch, C. J.; Vachal, P.; Davies, I. W.; Cernak, T.; Dreher, S. D. Organic chemistry. Nanomole-scale high-throughput chemistry for the synthesis of complex molecules. *Science (New York, N.Y.)* **2015**, 347, 49-53.
103. Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, 1302-1315.
104. Gesmundo, N. J.; Sauvagnat, B.; Curran, P. J.; Richards, M. P.; Andrews, C. L.; Dandliker, P. J.; Cernak, T. Nanoscale synthesis and affinity ranking. *Nature* **2018**, 557, 228-232.
105. Perera, D.; Tucker, J. W.; Brahmabhatt, S.; Helal, C. J.; Chong, A.; Farrell, W.; Richardson, P.; Sach, N. W. A platform for automated nanomole-scale reaction screening and micromole-scale synthesis in flow. *Science* **2018**, 359, 429-434.
106. Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 116-120.
107. Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A. Site-directed ligand discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97, 9367-9372.
108. Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 1053-1057.
109. Rideout, D. Self-Assembling Cytotoxins. *Science* **1986**, 233, 561-563.

110. Rideout, D.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J.; McCarthy, M. Synergism through direct covalent bonding between agents: A strategy for rational design of chemotherapeutic combinations. *Biopolymers* **1990**, *29*, 247-262.
111. Nonoo, R. H.; Armstrong, A.; Mann, D. J. Kinetic Template-Guided Tethering of Fragments. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 2082-2086.
112. Breugst, M.; Reissig, H.-U. The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, *59*, 12293-12307.
113. Manetsch, R.; Krasiński, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 12809-12818.
114. Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchya, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1977**, *30*, 275-282.
115. Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 127-132.
116. Forbes, S. A.; Beare, D.; Gunasekaran, P.; Leung, K.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Ding, M.; Bamford, S.; Cole, C.; Ward, S.; Kok, C. Y.; Jia, M.; De, T.; Teague, J. W.; Stratton, M. R.; McDermott, U.; Campbell, P. J. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, D805-D811.
117. Visscher, M.; Arkin, M. R.; Dansen, T. B. Covalent targeting of acquired cysteines in cancer. *Current Opinion in Chemical Biology* **2016**, *30*, 61-67.
118. Hunter, J. C.; Manandhar, A.; Carrasco, M. A.; Gurbani, D.; Gondi, S.; Westover, K. D. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Molecular Cancer Research* **2015**, *13*, 1325-1335.
119. Hunter, J. C.; Gurbani, D.; Ficarro, S. B.; Carrasco, M. A.; Lim, S. M.; Choi, H. G.; Xie, T.; Marto, J. A.; Chen, Z.; Gray, N. S.; Westover, K. D. In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic

- K-Ras G12C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, 111, 8895-8900.
120. Müller, M. P.; Jeganathan, S.; Heidrich, A.; Campos, J.; Goody, R. S. Nucleotide based covalent inhibitors of KRas can only be efficient in vivo if they bind reversibly with GTP-like affinity. *Scientific Reports* **2017**, 7, 3687.
121. Wiegandt, D.; Vieweg, S.; Hofmann, F.; Koch, D.; Li, F.; Wu, Y.-W.; Itzen, A.; Müller, M. P.; Goody, R. S. Locking GTPases covalently in their functional states. *Nat Commun* **2015**, 6, 7773.
122. Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D. Mutant-Specific Targeting of Ras G12C Activity by Covalently Reacting Small Molecules. *Cell Chemical Biology* **2019**, 26, 1338-1348.
123. Eberth, A.; Dvorsky, R.; Becker, C. F. W.; Beste, A.; Goody, R. S.; Ahmadian, M. R. Monitoring the real-time kinetics of the hydrolysis reaction of guanine nucleotide-binding proteins. **2005**, 386, 1105-1114.
124. Cremo, C. R. [5] Fluorescent nucleotides: Synthesis and characterization. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 2003; Vol. 360, pp 128-177.
125. Wolber, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, 45, 160-169.
126. Burge, R. A.; Hobbs, G. A. Chapter Two - Not all RAS mutations are equal: A detailed review of the functional diversity of RAS hot spot mutations. In *Advances in Cancer Research*, O'Bryan, J. P.; Piazza, G. A., Eds. Academic Press: 2022; Vol. 153, pp 29-61.
127. Meier, C.; Meerbach, A.; Balzarini, J. Cyclosal-pronucleotides—development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy. *FBL* **2004**, 9, 873-890.
128. Meier, C. Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs - An unsolvable task? *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2017**, 25, 69-82.
129. Morstein, J.; Bowcut, V.; Fernando, M.; Yang, Y.; Zhu, L.; Jenkins, M. L.; Evans, J. T.; Guiley, K. Z.; Peacock, D. M.; Krahnke, S.; Lin, Z.; Taran, K. A.; Huang, B. J.; Stephen, A. G.; Burke, J. E.; Lightstone, F. C.; Shokat, K. M. Targeting Ras-, Rho-, and Rab-family GTPases via a conserved cryptic pocket. *Cell* **2024**.

130. Brazel, D.; Nagasaka, M. Divarasilb in the Evolving Landscape of KRAS G12C Inhibitors for NSCLC. *Targeted Oncology* **2024**, *19*, 297-301.
131. Nilewski, C.; Labadie, S.; Wei, B.; Malhotra, S.; Do, S.; Gazzard, L.; Liu, L.; Shao, C.; Murray, J.; Izrayelit, Y.; Gustafson, A.; Endres, N. F.; Ma, F.; Ye, X.; Zou, J.; Evangelista, M. Structure-Based Design and Evaluation of Reversible KRAS G13D Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2024**, *15*, 21-28.
132. Burke, M. D.; Schreiber, S. L. A Planning Strategy for Diversity-Oriented Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 46-58.
133. Blakemore, D. C.; Castro, L.; Churcher, I.; Rees, D. C.; Thomas, A. W.; Wilson, D. M.; Wood, A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 383-394.
134. Corey, E. J. The Logic of Chemical Synthesis: Multistep Synthesis of Complex Carbogenic Molecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 455-465.
135. Garcia, Y.; Schoenebeck, F.; Legault, C. Y.; Merlic, C. A.; Houk, K. N. Theoretical Bond Dissociation Energies of Halo-Heterocycles: Trends and Relationships to Regioselectivity in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6632-6639.
136. Miyaura, N.; Yano, T.; Suzuki, A. The palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with allylic or benzylic bromides. Convenient syntheses of 1,4-alkadienes and allybenzenes from alkynes via hydroboration. *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 2865-2868.
137. Amatore, C.; Jutand, A.; Le Duc, G. Kinetic Data for the Transmetalation/Reductive Elimination in Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Reactions: Unexpected Triple Role of Hydroxide Ions Used as Base. *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 2492-2503.
138. Caplow, M. Kinetics of carbamate formation and breakdown. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 6795-6803.
139. Quambusch, L.; Depta, L.; Landel, I.; Lubeck, M.; Kirschner, T.; Nabert, J.; Uhlenbrock, N.; Weisner, J.; Kostka, M.; Levy, L. M.; Schultz-Fademrecht, C.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Müller, M. P.; Siveke, J. T.; Rauh, D. Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of Akt inhibitors. *Nat Commun* **2021**, *12*, 5297.

140. Johnson, C. W.; Lin, Y.-J.; Reid, D.; Parker, J.; Pavlopoulos, S.; Dischinger, P.; Graveel, C.; Aguirre, A. J.; Steensma, M.; Haigis, K. M.; Mattos, C. Isoform-Specific Destabilization of the Active Site Reveals a Molecular Mechanism of Intrinsic Activation of KRas G13D. *Cell Reports* **2019**, 28, 1538-1550.e7.
141. Manning, B. D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, 169, 381-405.
142. Szymonowicz, K.; Oeck, S.; Malewicz, N. M.; Jendrossek, V. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. In *Cancers*, 2018; Vol. 10.
143. Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D. Proteus in the World of Proteins: Conformational Changes in Protein Kinases. *Archiv der Pharmazie* **2010**, 343, 193-206.
144. Vivanco, I.; Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2, 489-501.
145. Hanada, M.; Feng, J.; Hemmings, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2004**, 1697, 3-16.
146. Pervanidis, K. A.; D'Angelo, G. D.; Weisner, J.; Brandherm, S.; Rauh, D. Akt Inhibitor Advancements: From Capivasertib Approval to Covalent-Allosteric Promises. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, 67, 6052-6063.
147. Turner Nicholas, C.; Oliveira, M.; Howell Sacha, J.; Dalenc, F.; Cortes, J.; Gomez Moreno Henry, L.; Hu, X.; Jhaveri, K.; Krivorotko, P.; Loibl, S.; Morales Murillo, S.; Okera, M.; Park Yeon, H.; Sohn, J.; Toi, M.; Tokunaga, E.; Yousef, S.; Zhukova, L.; de Bruin Elza, C.; Grinsted, L.; Schiavon, G.; Foxley, A.; Rugo Hope, S. Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2023**, 388, 2058-2070.
148. Jones, P. F.; Jakubowicz, T.; Pitossi, F. J.; Maurer, F.; Hemmings, B. A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88, 4171-4175.

149. Staal, S. P.; Huebner, K.; Croce, C. M.; Parsa, N. Z.; Testa, J. R. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **1988**, *2*, 96-98.
150. Cheng, J. Q.; Godwin, A. K.; Bellacosa, A.; Taguchi, T.; Franke, T. F.; Hamilton, T. C.; Tschlis, P. N.; Testa, J. R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 9267-9271.
151. Nakatani, K.; Thompson, D. A.; Barthel, A.; Sakaue, H.; Liu, W.; Weigel, R. J.; Roth, R. A. Up-regulation of Akt3 in Estrogen Receptor-deficient Breast Cancers and Androgen-independent Prostate Cancer Lines*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 21528-21532.
152. Gonzalez, E.; McGraw, T. E. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2502-2508.
153. Dummler, B.; Hemmings, B. A. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35*, 231-235.
154. Santi, S. A.; Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2009**, *298*, C580-C591.
155. Calleja, V.; Laguerre, M.; Parker, P. J.; Larijani, B. Role of a Novel PH-Kinase Domain Interface in PKB/Akt Regulation: Structural Mechanism for Allosteric Inhibition. *PLOS Biology* **2009**, *7*, e1000017.
156. Yu, Y.; Savage, R. E.; Eathiraj, S.; Meade, J.; Wick, M. J.; Hall, T.; Abbadessa, G.; Schwartz, B. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0140479.
157. Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D. A.; Libra, M.; Tsatsakis, A. M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **2016**, *48*, 869-885.
158. Lapierre, J.-M.; Eathiraj, S.; Vensel, D.; Liu, Y.; Bull, C. O.; Cornell-Kennon, S.; Jimura, S.; Kelleher, E. W.; Kizer, D. E.; Koerner, S.; Makhija, S.; Matsuda, A.; Moussa, M.; Namdev, N.; Savage, R. E.; Szwaya, J.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Schwartz, B. Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable,

Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59, 6455-6469.

159. Weisner, J.; Gontla, R.; van der Westhuizen, L.; Oeck, S.; Ketzner, J.; Janning, P.; Richters, A.; Mühlenberg, T.; Fang, Z.; Taher, A.; Jendrossek, V.; Pelly, S. C.; Bauer, S.; van Otterlo, W. A. L.; Rauh, D. Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54, 10313-10316.

160. Quambusch, L.; Landel, I.; Depta, L.; Weisner, J.; Uhlenbrock, N.; Müller, M. P.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Siveke, J. T.; Rauh, D. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, 58, 18823-18829.

161. Liu, S.-L.; Wang, Z.-G.; Hu, Y.; Xin, Y.; Singaram, I.; Gorai, S.; Zhou, X.; Shim, Y.; Min, J.-H.; Gong, L.-W.; Hay, N.; Zhang, J.; Cho, W. Quantitative Lipid Imaging Reveals a New Signaling Function of Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate: Isoform- and Site-Specific Activation of Akt. *Molecular Cell* **2018**, 71, 1092-1104.e5.

162. Huber, M.; Helgason, C. D.; Damen, J. E.; Scheid, M.; Duronio, V.; Liu, L.; Ware, M. D.; Humphries, R. K.; Krystal, G. The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1999**, 71, 423-434.

163. Tschopp, O.; Yang, Z.-Z.; Brodbeck, D.; Dummler, B. A.; Hemmings-Mieszczak, M.; Watanabe, T.; Michaelis, T.; Frahm, J.; Hemmings, B. A. Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **2005**, 132, 2943-2954.

164. Cho, H.; Mu, J.; Kim, J. K.; Thorvaldsen, J. L.; Chu, Q.; Crenshaw, E. B.; Kaestner, K. H.; Bartolomei, M. S.; Shulman, G. I.; Birnbaum, M. J. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). *Science* **2001**, 292, 1728-1731.

165. Garofalo, R. S.; Orena, S. J.; Rafidi, K.; Torchia, A. J.; Stock, J. L.; Hildebrandt, A. L.; Coskran, T.; Black, S. C.; Brees, D. J.; Wicks, J. R.; McNeish, J. D.; Coleman, K. G. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *The Journal of Clinical Investigation* **2003**, 112, 197-208.

166. Stockwell, B. R. Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nature Reviews Genetics* **2000**, 1, 116-125.

167. Bunnage, M. E.; Chekler, E. L. P.; Jones, L. H. Target validation using chemical probes. *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 195-199.
168. Stockwell, B. R. Exploring biology with small organic molecules. *Nature* **2004**, *432*, 846-854.
169. Evans, M. J.; Cravatt, B. F. Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3279-3301.
170. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
171. Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 4905-4979.
172. Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4686-4687.
173. Quistgaard, E. M. BAP31: Physiological functions and roles in disease. *Biochimie* **2021**, *186*, 105-129.
174. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 795-800.
175. Read, R. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallographica Section D* **2001**, *57*, 1373-1382.
176. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **2004**, *60*, 2126-2132.
177. Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D* **2012**, *68*, 352-367.
178. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for

macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 213-221.

179. Joosten, R. P.; Long, F.; Murshudov, G. N.; Perrakis, A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ* **2014**, *1*, 213-220.

180. Zhang, Z.; Marshall, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 225-33.

181. Kirschner, T.; Rodriguez, J.; Moreira, E. G.; Niggenaber, J.; Warmuth, J. D.; Verli, H.; Müller, M. P.; Rauh, D. Targeting KRAS^{G13C} with cyclic linker-based inhibitors to explore warhead orientation. *Scientific Reports* **2025**, *15*, 38213.

Anhang

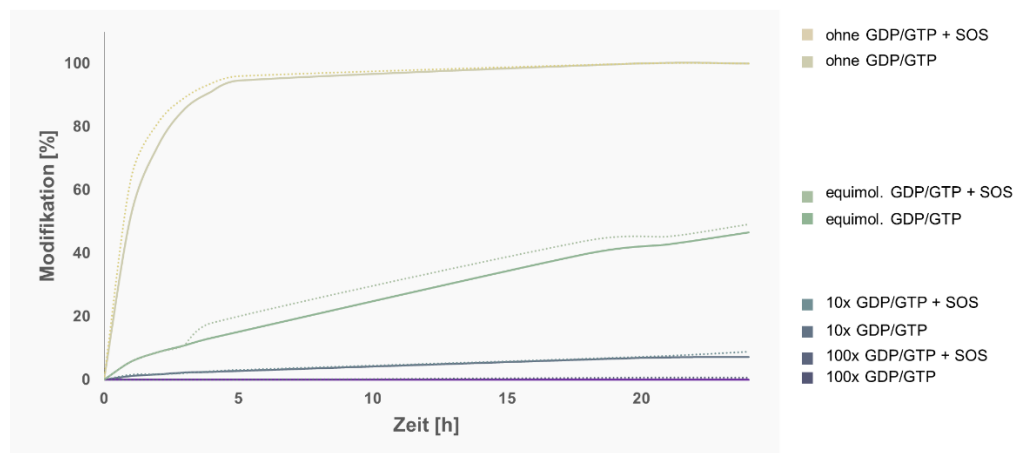
Kompetitiver Assay von eda-GDP für KRAS^{G13C}

Abbildung 62. Kovalente Proteinmodifikation mit Acryl-edaGDP (**15a**) in Gegenwart von konkurrierendem GDP/GTP (äquimolare Konzentration / 10- und 100-facher Überschuss) in An- und Abwesenheit von SOS.

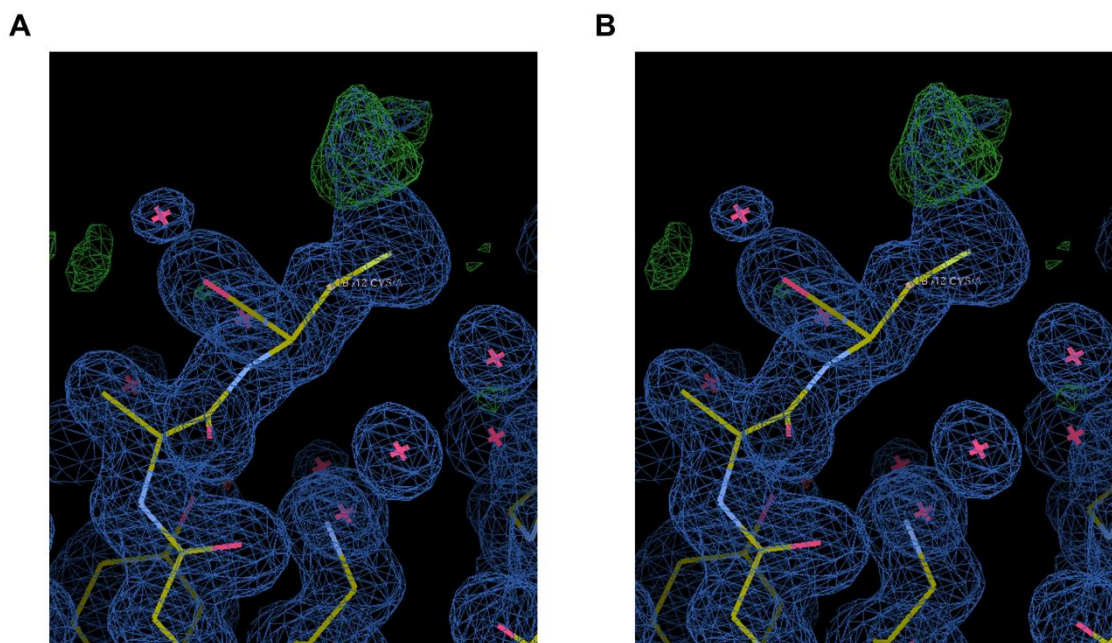
Kristallisation von KRAS^{G12C}:GDP Soaking-Experiment mit **6c**

Abbildung 63. A: Elektronendichte von KRAS^{G12C} mit vermeintlicher, partieller Dichte der Verbindung **6c** am Cys12 der Kette A. **B:** Elektronendichte von KRAS^{G12C} mit vermeintlicher, partieller Dichte der Verbindung **6c** am Cys12 der Kette B. Elektronendichte konturiert bei einem r.m.s.d. von 1. Die Kristallstruktur wurde von Dr. Janina Niggenaber gelöst.

Kristallisation von KRAS^{G13C}- **15b**

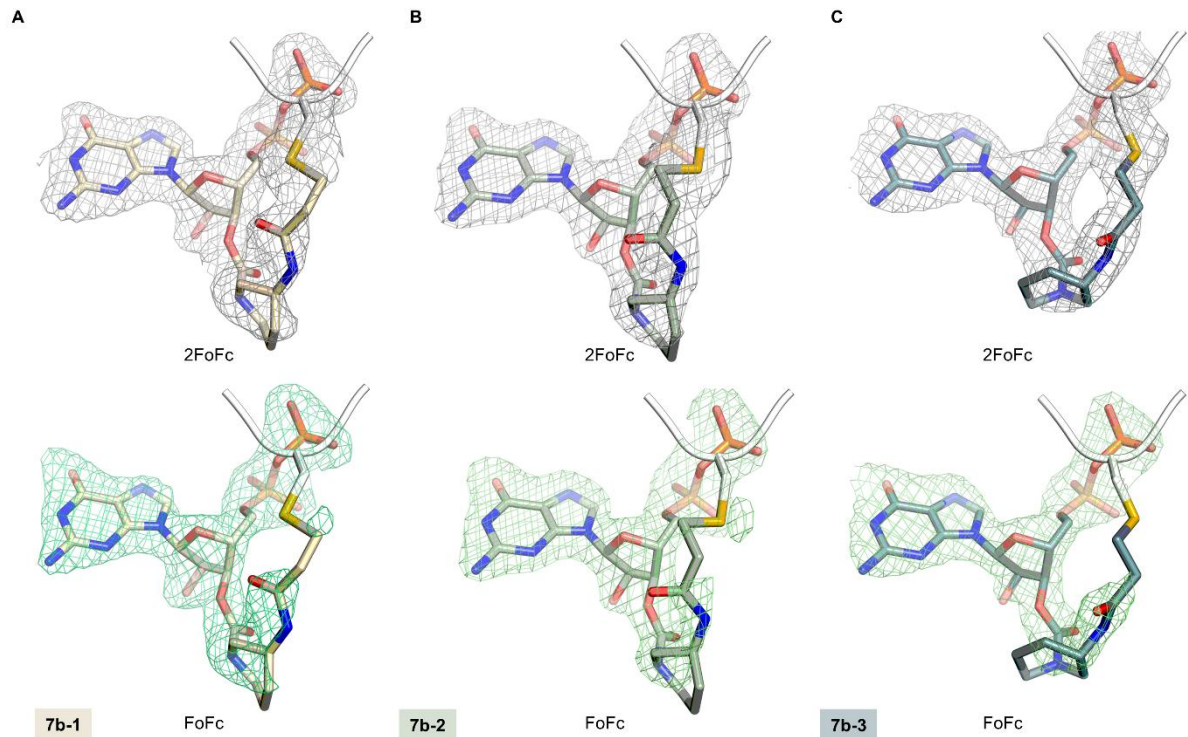


Abbildung 64. A-C: Darstellung der unterschiedlichen Linkerkonformationen von **15b** der drei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. FoFc- und 2FoFc-Elektronendichtekarte wurden konturiert bei einem r.m.s.d. von 1.

MD-Simulationen

Molekül	Wahrscheinlichkeit [%]
15a	8.84
15b	8.06
15f	3.21
15g	0.01
15h	0.00
15i	0.26

Abbildung 65. Prozentuale Wahrscheinlichkeit, dass die Linker der gezeigten Moleküle eine Konformation einnehmen, welche in der Lage ist kovalent mit dem Cys13 zu reagieren. Die Daten wurden von Prof. Dr. Hugo Verli und Mitarbeitenden seiner Arbeitsgruppe erhoben.

Datenstatistiken der K/NRAS-Kristallstrukturen

Tabelle 8. Datenstatistiken der KRAS-Komplexstrukturen. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. Zur Bestimmung der Komplexstruktur wurden Beugungsdaten eines Einkristalls verwendet. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung. Die Kristallstrukturen wurden von Dr. Janina Niggenaber gelöst.

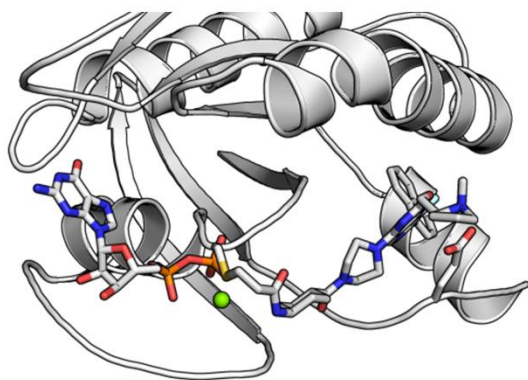
	KRAS ^{G12C} : GDP	KRAS ^{G12C} + partielle Dichte RL3636 (6c)	KRAS ^{G13C} - 15b	HRAS ^{G13C} : GDP	HRAS ^{G13C} : MRTX1133 (2)
DATA COLLECTION					
Space group	P3 143	P3 143	C 1 2 1 (5)	P ₆ 3 2 2 182	C 2 2 2 ₁ (20)
Cell dimensions					
a, b, c [Å]	84.15, 84.15, 41.53	84.52, 84.49, 41.93	70.01, 84.76, 88.77	120.29, 120.29, 52.91	39.96, 80.39, 98.83
α, β, γ [°]	90.0, 90.0, 120.0	89.97, 90.05 119.98	90.0, 113.26, 90.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolution [Å]	50.00-1.40 (1.50-1.40)	50.00-1.55 (1.60-1.55)	50.00-1.85 (1.90-1.85)	50.00-1.80 (1.90-1.80)	30.00-1.80 (1.90-1.80)
R _{meas} [%]	10.0 (91.4)	7.1 (96.9)	4.6 (126.9)	17.9 (199.2)	21.4 (140.2)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	11.67 (1.89)	12.25 (1.55)	18.37 (1.37)	15.50 (2.72)	18.37 (1.37)
Completeness [%]	97.2 (95.4)	96.5 (96.5)	99.8 (99.7)	99.9 (100.0)	99.7 (100.0)
CC _{1/2}	99.9 (79.2)	99.9 (65.0)	99.9 (61.8)	99.9 (68.0)	99.8 (70.9)
Redundancy	10.97 (11.02)	5.55 (5.68)	6.86 (6.43)	39.86 (42.11)	13.21 (11.36)
REFINEMENT					
Resolution [Å]	42.08-1.40 (1.50-1.40)	42.26-1.55 (1.60-1.55)	42.38-1.85 (1.90-1.85)	37.12-1.80 (1.90-1.80)	40.20-1.80 (1.90-1.80)
No. reflections	62979	46937	40651	21394	15099
R _{work} / R _{free}	16.90 / 18.79 (24.46 / 25.76)	17.01 / 20.27 (29.83 / 34.45)	18.98 / 22.78 (55.79 / 54.51)	17.54 / 19.75 (25.27 / 26.75)	17.79 / 20.88 (23.69 / 29.10)
No. atoms					
Protein	chain A = 1358 chain B = 1352	chain A = 1373 chain B = 1314 total: 2687	chain A = 1249	1311	1348

Anhang

	total: 2710		chain B = 1247 chain C = 1140 total: 3636		
GDP	2 x 28	2 x 28	3 x 41	28	44
Ions (Mg ²⁺)	2	3	3	1	28
Water	312	249	128	124	1
<i>B</i> -factors					136
Protein	chain A = 24.06 chain B = 22.80	chain A = 29.82 chain B = 27.51	chain A = 56.28 chain B = 62.13 chain C = 61.55	37.37	
GDP	16.97	19.43	chain A = 52.72 chain B = 52.18 chain C = 62.00	31.40	20.65
Ions (Mg ²⁺)	15.10	22.00	52.85	26.79	17.81
Water	31.50	36.87	55.83	43.11	15.11
R.m.s. deviations					24.43
Bond lengths [Å]	0.09	0.010	0.011	0.006	0.013
Bond angles [°]	1.102	1.122	1.249	0.873	1.486
Ramachandran [%]					
Outliers	0	0	0	0	0
Allowed	2.80	0.95	1.75	1.27	1.82
Favored	97.20	99.05	98.25	98.73	98.18
Rotamer [%]					
Outliers				2.07	0.68
Allowed	0	0.33	0.78	5.52	1.37
Favored				92.41	97.95

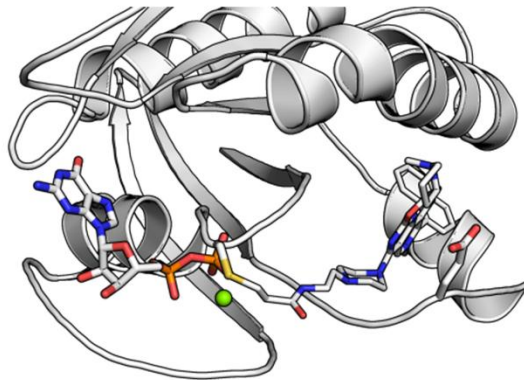
Repräsentative Dockingergebnisse der Verbindungen **26a**, **26b** und **26c**

A



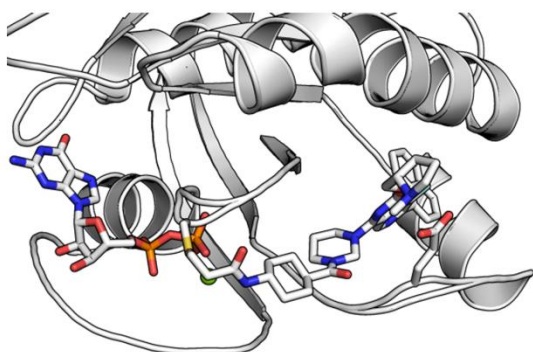
Verbindung 26b

B



Verbindung 26c

C



Verbindung 26a

Abbildung 66. Kovalente *Docking*-Ergebnisse der Verbindungen **26b** (**A**), **26c** (**B**) und **26a** (**C**) in KRAS^{G13C}:GDP. Die *Docking*-Posen wurden mit Programm GOLD und der *Scoring*-Funktion ChemPLP generiert.

Vollständige Proteinreinigung von HRAS^{G13C} (Cys-light)

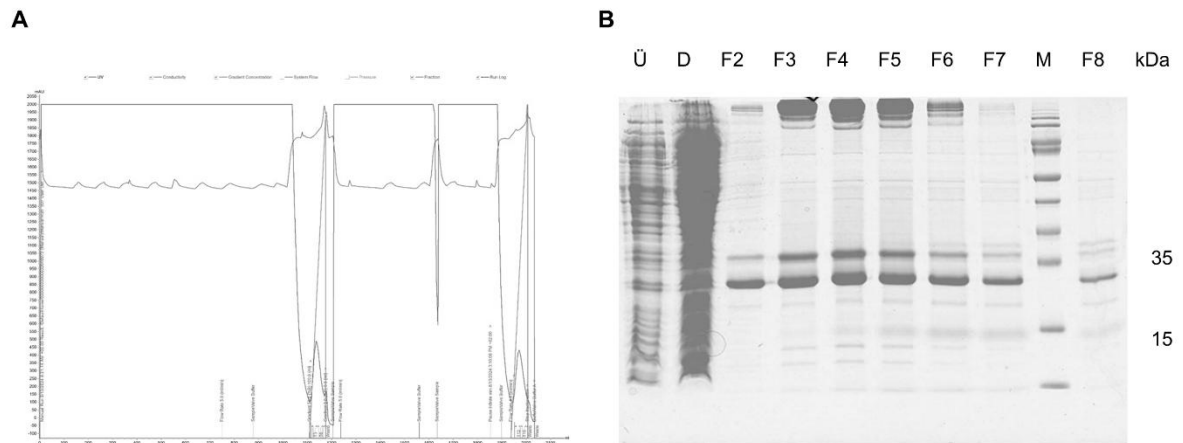


Abbildung 67. Erste Ni²⁺-Affinitätschromatographie. **A:** Chromatogramm der ersten Ni-AC des HRAS^{G13C}-Konstrukts. **B:** Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Ü: Überstand vor der Zentrifugation, D: Durchfluss, Eluatfraktionen 2-8). Die Proteinexpression und -Reinigung wurde von Andreas Arndt, AG Rauh durchgeführt.

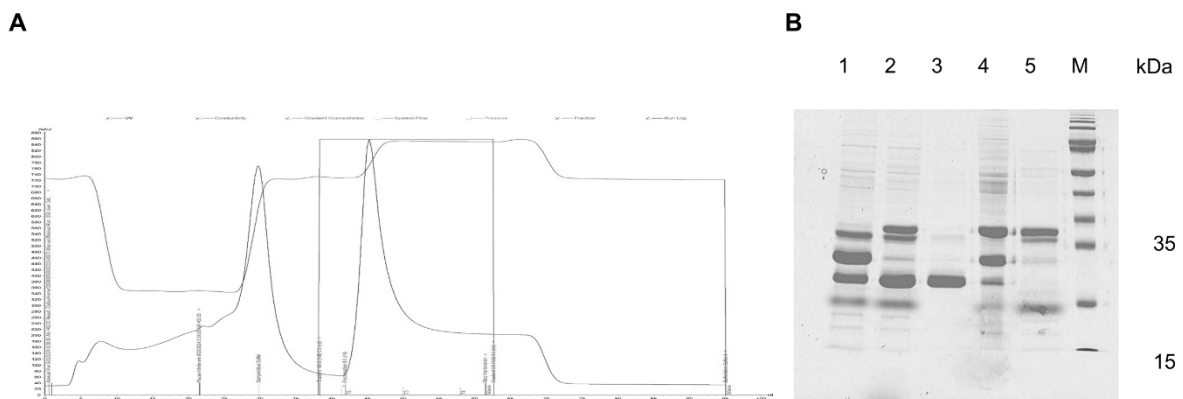


Abbildung 68. Reverse Ni²⁺-Affinitätschromatographie. **A:** Chromatogramm der zweiten reversen Ni-AC des HRAS^{G13C}-Konstrukts. **B:** Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 1: Pool HRAS^{G13C} - TEV, 2: HRAS^{G13C}-Verdau mit TEV, 3: Durchlauf, 4: Pellet, 5: Elution). Die Proteinexpression und -Reinigung wurde von Andreas Arndt, AG Rauh durchgeführt.

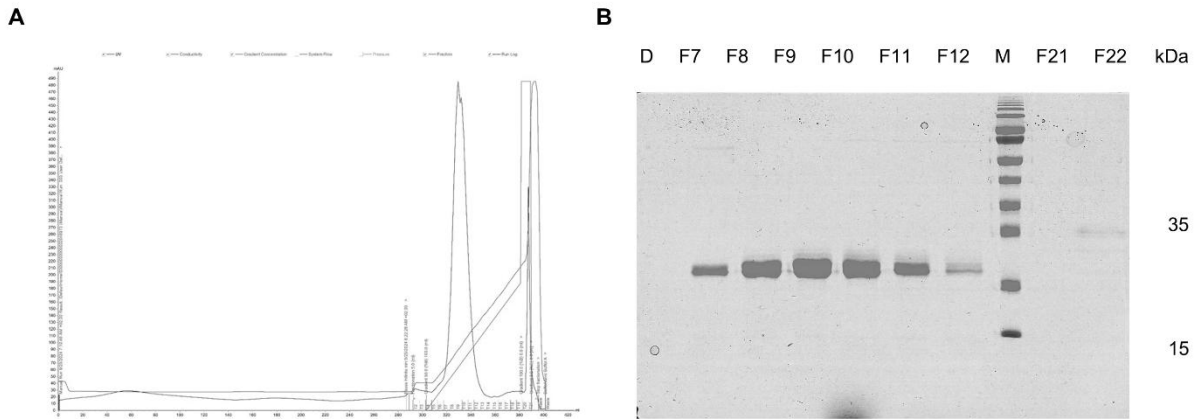


Abbildung 69. Anionenaustausch-Chromatographie. **A:** Chromatogramm der IEX des HRAS^{G13C}-Konstrukts. **B:** Analyse der Fraktionen der IEX mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Eluatfraktionen 7-12 und 21-22). Die Proteinexpression und -Reinigung wurde von Andreas Arndt, AG Rauh durchgeführt.

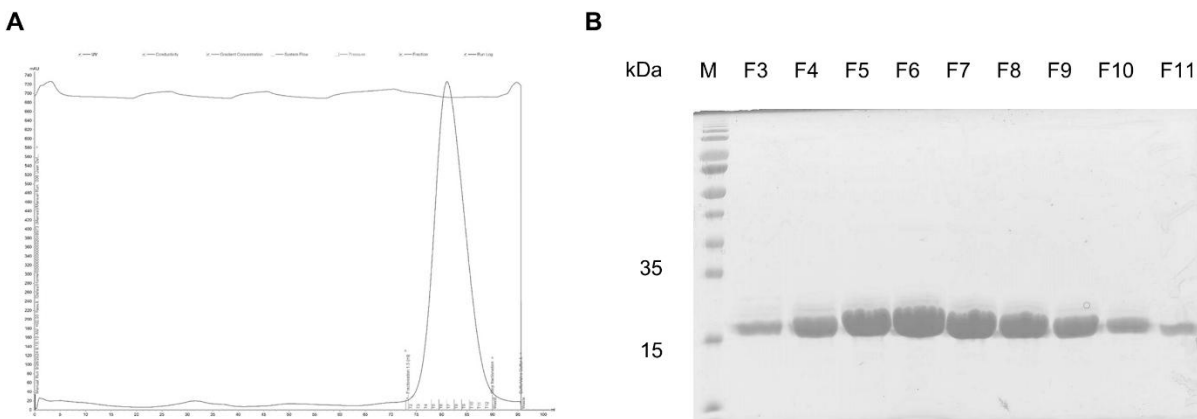


Abbildung 70. Größenausschluss-Chromatographie. **A:** Chromatogramm der SEC des HRAS^{G13C}-Konstrukts. **B:** Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Eluatfraktionen 3-11). Die Proteinexpression und -Reinigung wurde von Andreas Arndt, AG Rauh durchgeführt.

Sequenzvergleich on KRAS^{G13C} und HRAS^{G13C} (*Cys-light*)

```

KRasG13C      1  GHMTEYKLVVVGAGCVGKSALTIQLIQNHVFVEYDPTIEDSYRKQVVIDGETSLLDILDT
HRasG13C      1  GHMTEYKLVVVGAGCVGKSALTIQLIQNHVFVEYDPTIEDSYRKQVVIDGETSLLDILDT
*****

KRasG13C      61  AGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLVFAINNPKSFEDIHHYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKS
HRasG13C      61  AGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLVFAINNPKSFEDIHQYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKS
*****

KRasG13C      121 DLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHKEK
HRasG13C      121 DLAARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRQH
**  **  *****
    
```

Abbildung 71. Sequenzvergleich der KRAS und HRAS G13C-Mutanten, als *Cys-light* Varianten. Die Cystein-Mutation an Position dreizehn ist rot und die *Cys-light*-Mutationen in grün markiert.

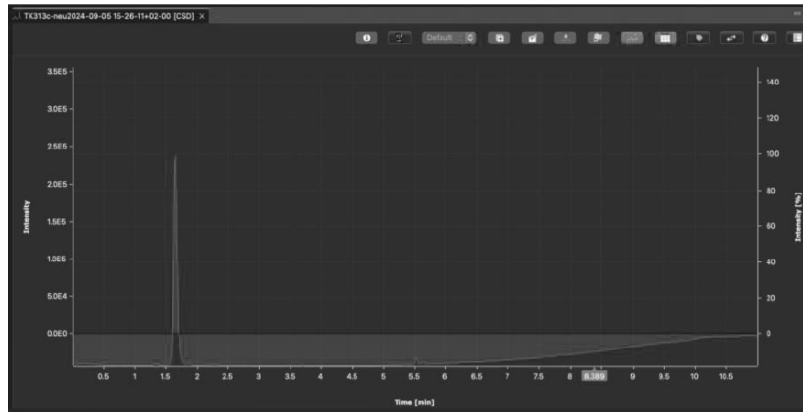
LC/MS-Spektren

Abbildung 72. UV-Chromatogramm des LC/MS-Spektrums von Verbindung 9. Das Chromatogramm wurde mit der frei zugänglichen Version von OPENCHROM geöffnet und visualisiert.

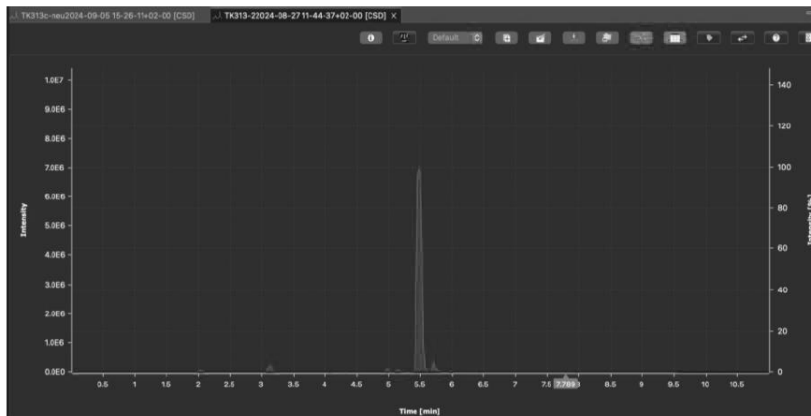


Abbildung 73. UV-Chromatogramm des LC/MS-Spektrums von Verbindung 5. Das Chromatogramm wurde mit der frei zugänglichen Version von OPENCHROM geöffnet und visualisiert.

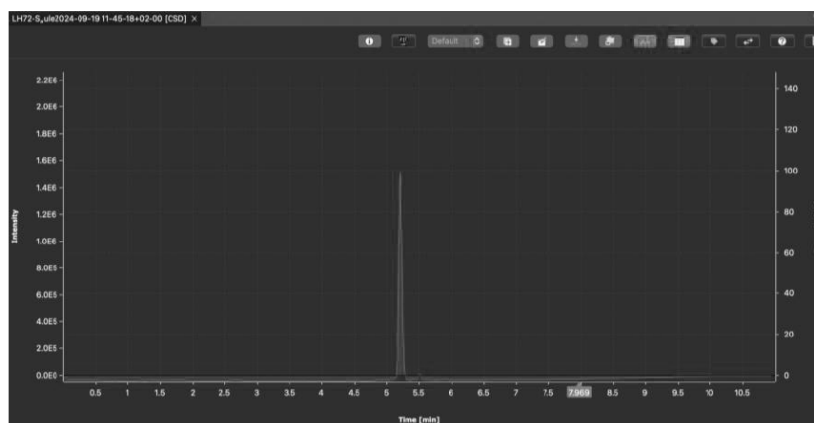


Abbildung 74. UV-Chromatogramm des LC/MS-Spektrums von Verbindung 6f. Das Chromatogramm wurde mit der frei zugänglichen Version von OPENCHROM geöffnet und visualisiert.

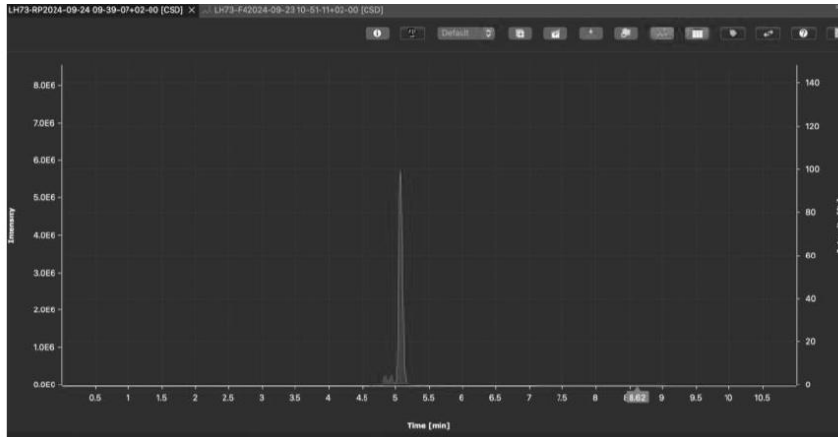
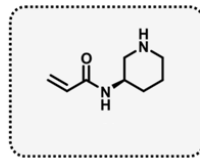


Abbildung 75. UV-Chromatogramm des LC/MS-Spektrums von Verbindung 6d. Das Chromatogramm wurde mit der frei zugänglichen Version von OPENCHROM geöffnet und visualisiert.



$[M+H]^+$ calculated for $C_8H_{15}N_2O$: 155.1

Retention time: $t_R = 1.8$ min

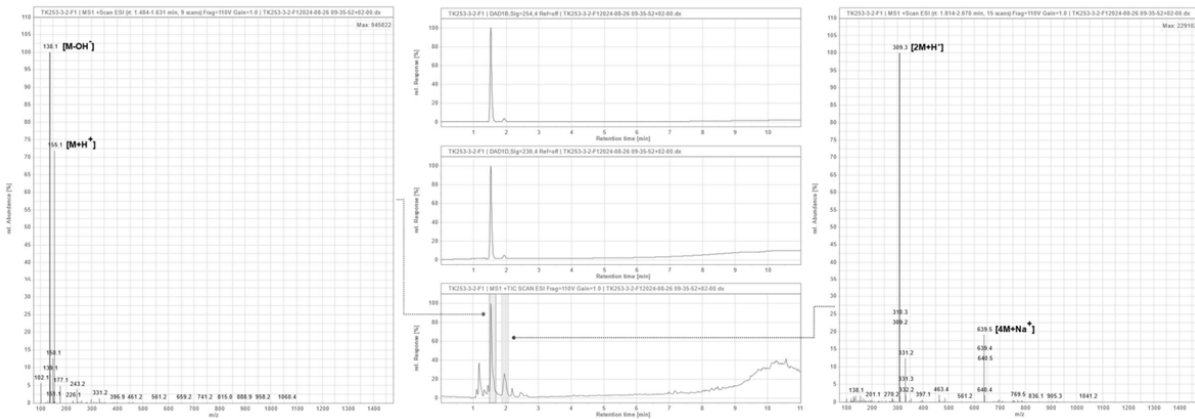
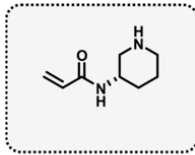


Abbildung 76. LC/MS-Spektrum von (*R*)-*N*-(piperidin-3-yl)acrylamid 12b. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



$[M+H]^+$ calculated for $C_8H_{15}N_2O$: 155.1

Retention time: $t_R = 1.4$ min

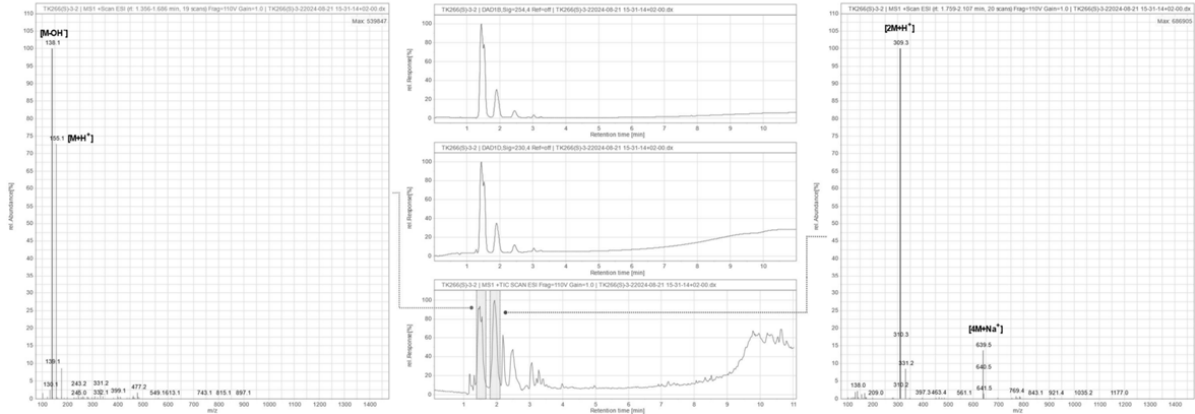
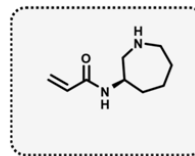


Abbildung 77. LC/MS-Spektrum von (*S*)-*N*-(piperidin-3-yl)acrylamid 12c. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. 181



$[M+H]^+$ calculated for $C_8H_{17}N_2O$: 169.1

Retention time: $t_R = 2$ min

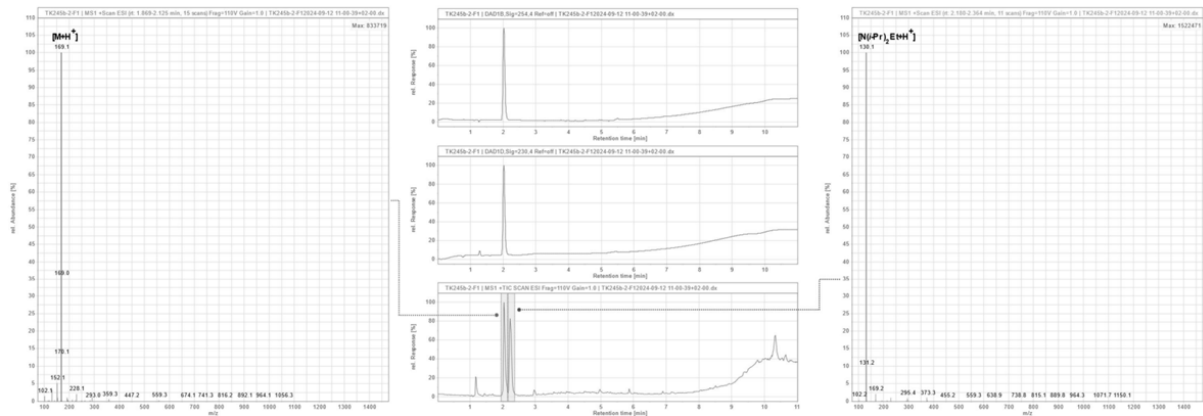
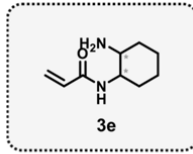


Abbildung 78. LC/MS-Spektrum von (*R*)-*N*-(azepan-3-yl)acrylamid 12d. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. 181

Anhang



$[M+H]^+$ calculated for $C_9H_{17}N_2O$: 169.1
Retention time: $t_R = 4.5$ min

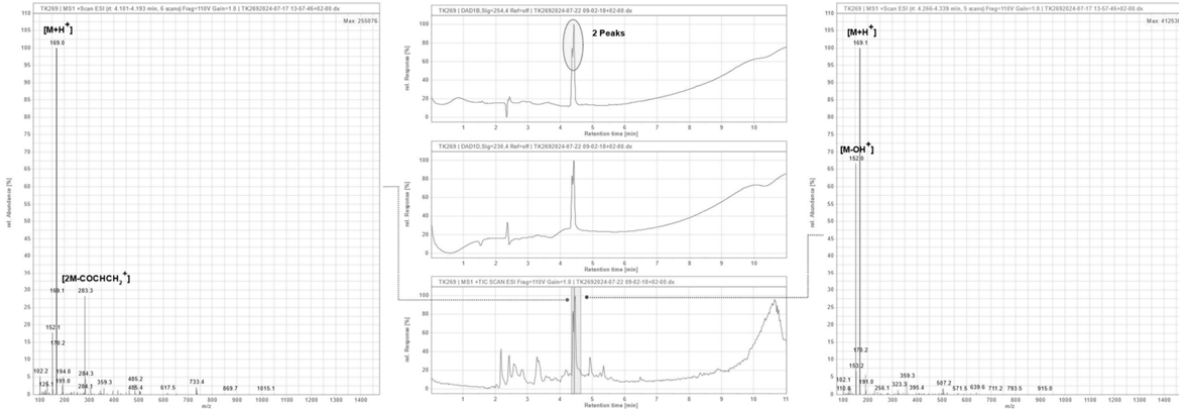
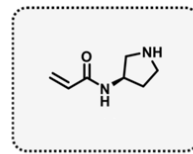


Abbildung 79. LC/MS-Spektrum von *N*-(2-aminocyclohexyl)acrylamid 12e. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.
181



$[M+H]^+$ calculated for $C_7H_{13}N_2O$: 141.1
Retention time: $t_R = 1.6$ min

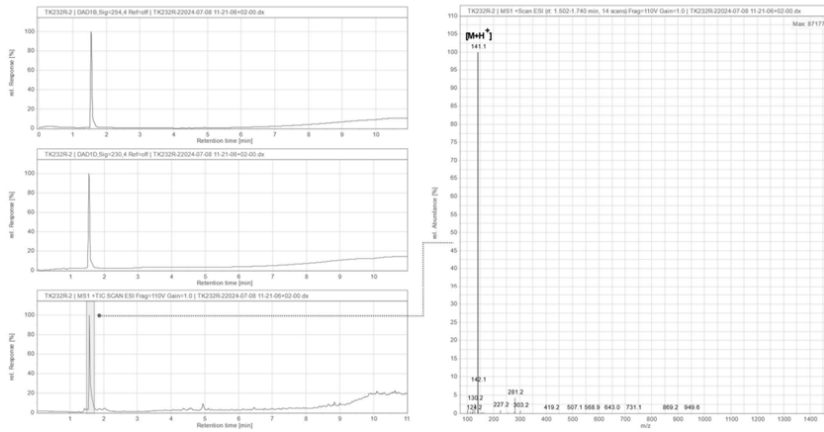
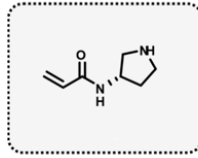


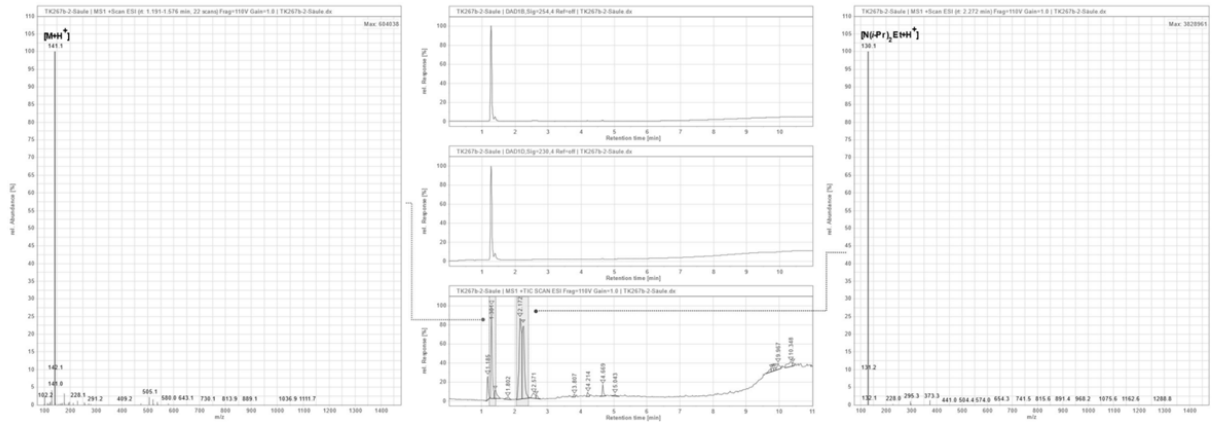
Abbildung 80. LC/MS-Spektrum von (*R*)-*N*-(pyrrolidin-3-yl)acrylamid 12f. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.
181

Anhang

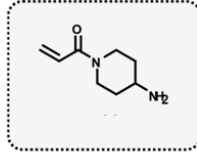


$[M+H]^+$ calculated for $C_7H_{13}N_2O$: 141.1

Retention time: $t_R = 1.3$ min



Anhang



$[M+H]^+$ calculated for $C_8H_{15}N_2O$: 155.1
Retention time: $t_R = 1.2$ min

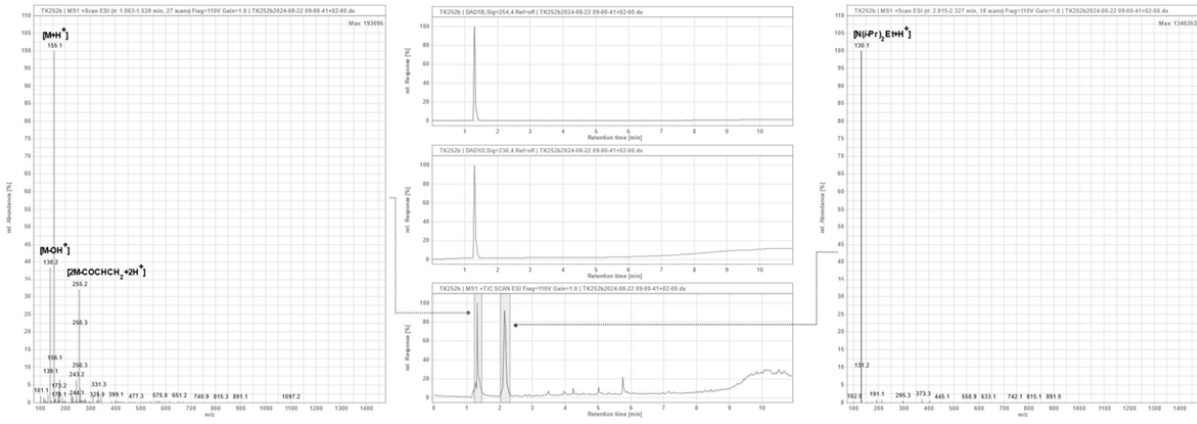
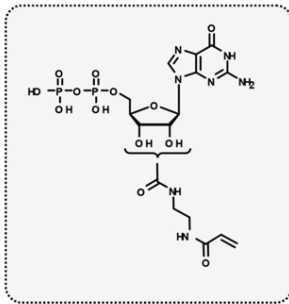


Abbildung 83. LC/MS-Spektrum von 1-(4-aminopiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on 12i. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. 181



$[M-H]^-$ calculated for $C_{16}H_{22}N_7O_{13}P_2$: 581.97
 $[M+H]^+$ calculated for $C_{16}H_{24}N_7O_{13}P_2^+$: 583.97

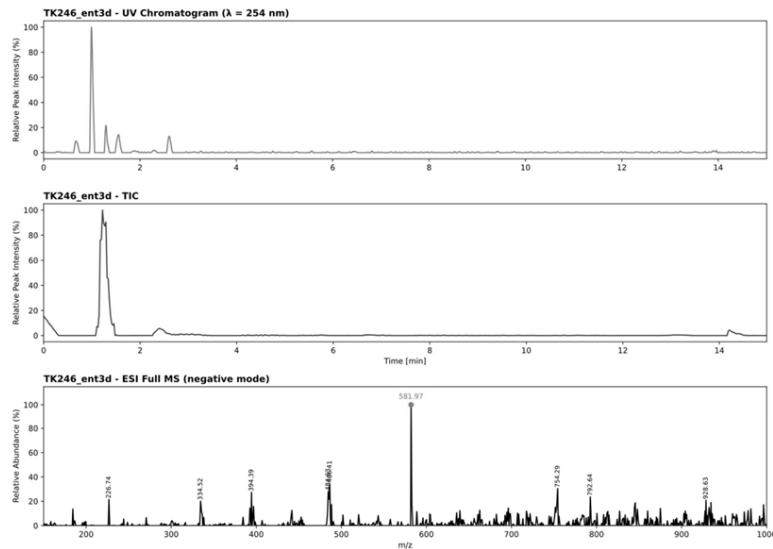
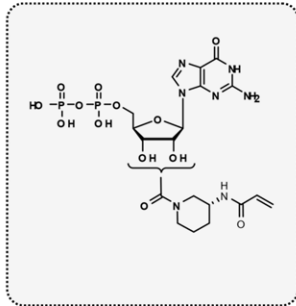


Abbildung 84. LC/MS-Spektrum von 15a. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. 181



$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 622.10

$[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{28}N_7O_{13}P_2^+$: 624.10

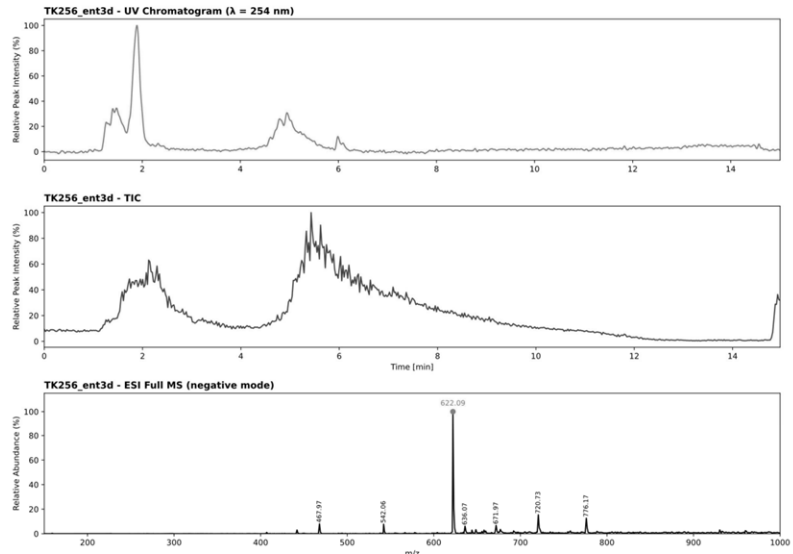
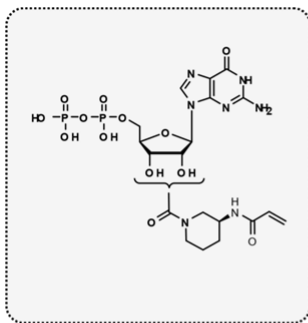


Abbildung 85. LC/MS-Spektrum von 15b. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 622.10

$[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{28}N_7O_{13}P_2^+$: 624.10

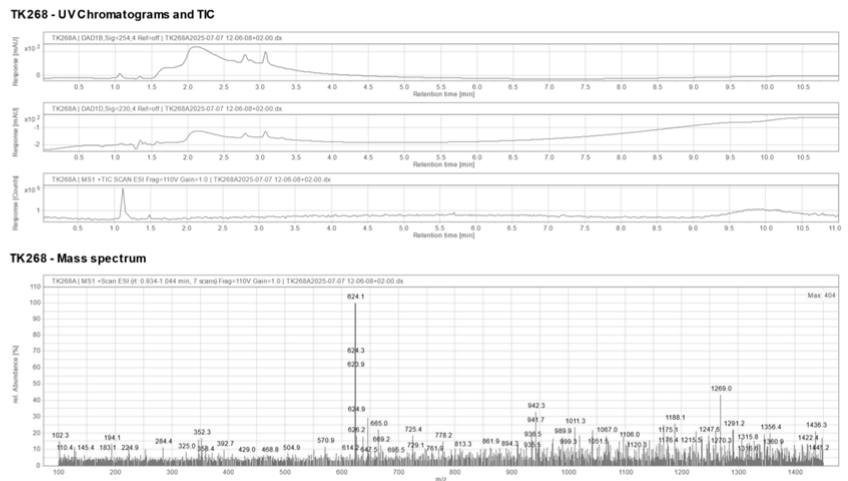
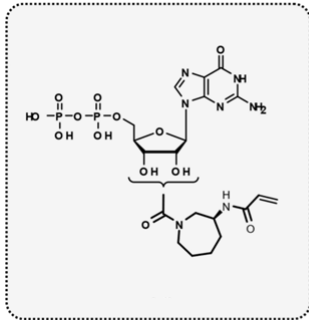


Abbildung 86. LC/MS-Spektrum von 15c. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



[M-H]⁻ calculated for C₂₀H₂₈N₇O₁₃P₂⁻: 636.10
 [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₃₀N₇O₁₃P₂⁺: 638.10

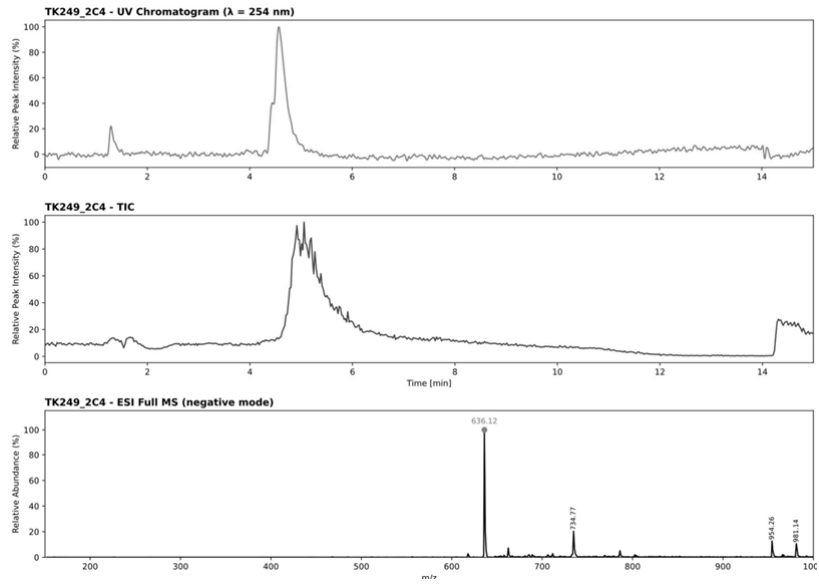
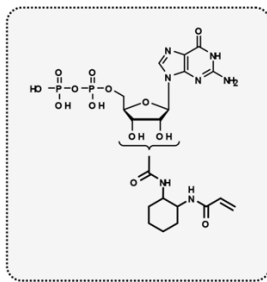


Abbildung 87. LC/MS-Spektrum von 15d. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



[M-H]⁻ calculated for C₂₀H₂₈N₇O₁₃P₂⁻: 636.04
 [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₃₀N₇O₁₃P₂⁺: 638.04

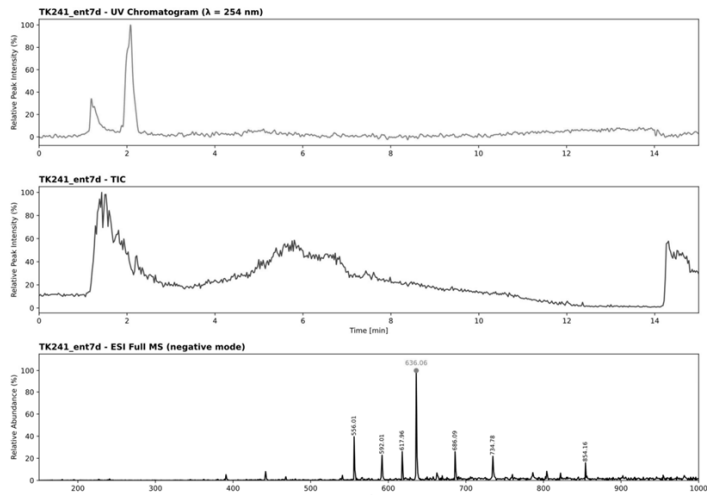


Abbildung 88. LC/MS-Spektrum von 15e. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

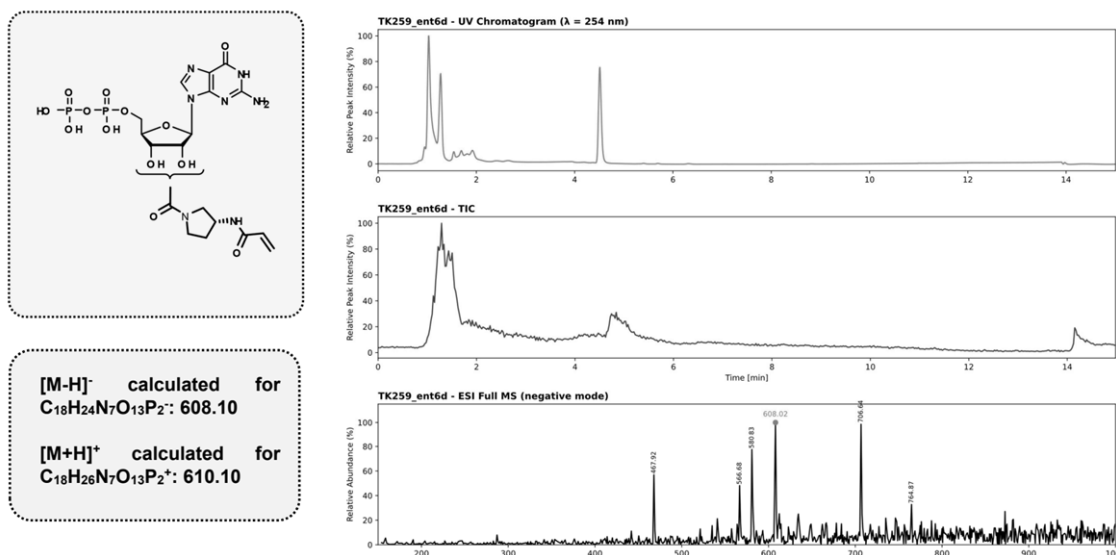


Abbildung 89. LC/MS-Spektrum von 15f. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. ¹⁸¹

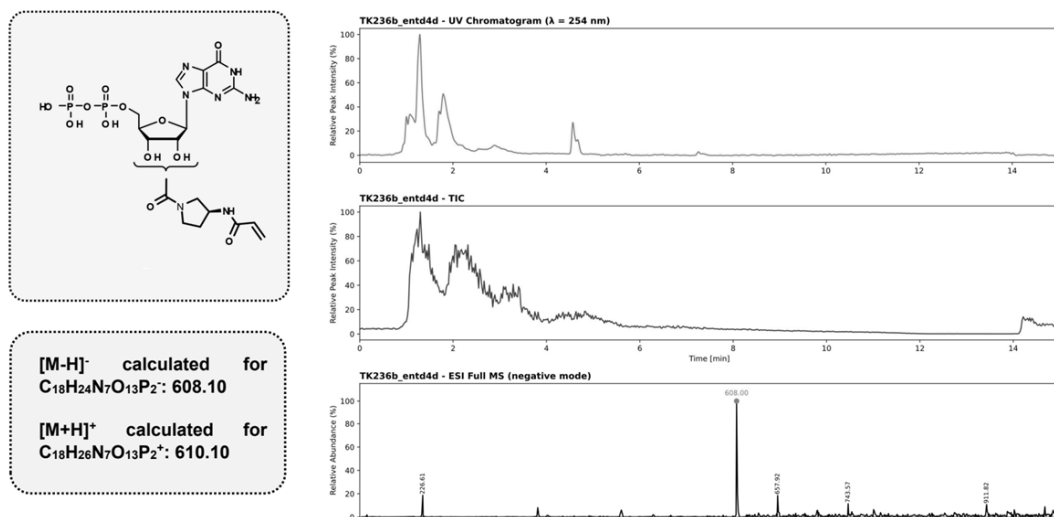
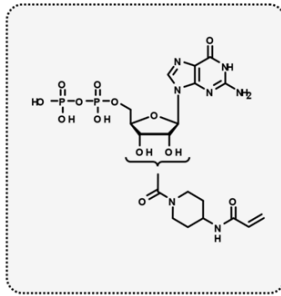


Abbildung 90. LC/MS-Spektrum von 15g. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. ¹⁸¹



$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 622.11
 $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 624.11

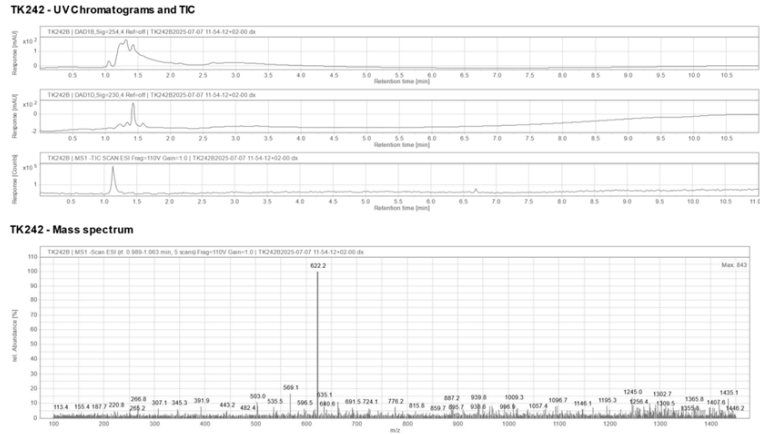
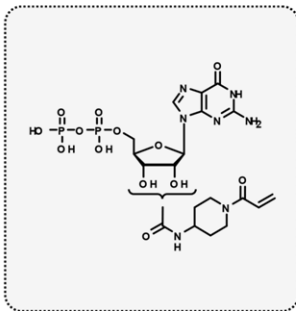


Abbildung 91. LC/MS-Spektrum von 15h. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 622.11
 $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$: 624.11

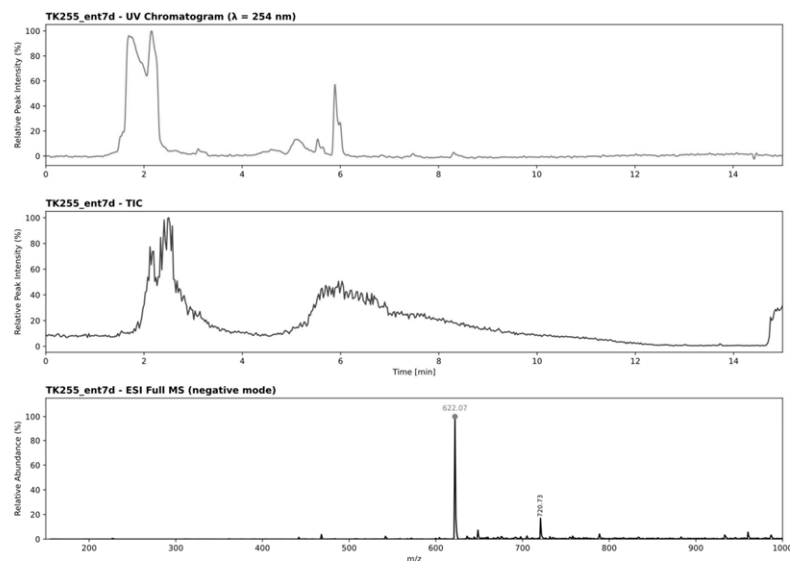
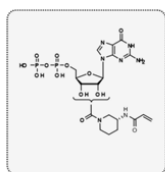


Abbildung 92. LC/MS-Spektrum von 15i. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

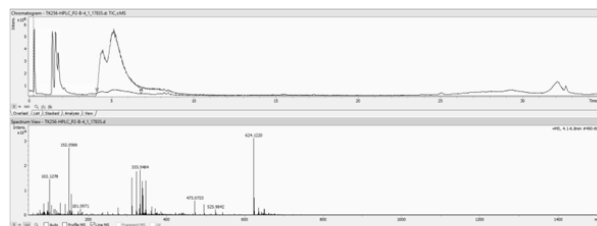
HRMS-Spektren



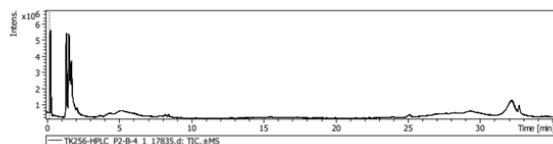
$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{28}N_7O_{13}P_2$:
622.10

$[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{28}N_7O_{13}P_2$:
624.10

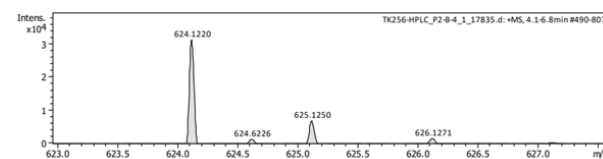
Spectra of peaks:



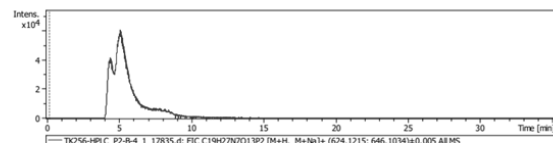
TIC:



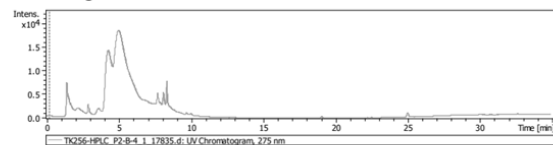
Mass spectrum



EIC:



UV-Chromatogram:



EIC und UV:

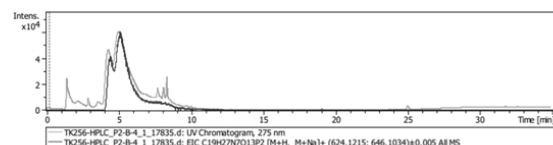
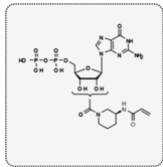


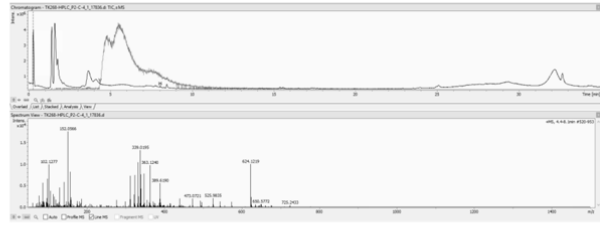
Abbildung 93. HRMS-Spektrum von 15b. $[M+H]^+$ mit $-0,9$ ppm Abweichung; Überlappung mit einer weiteren Masse. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹



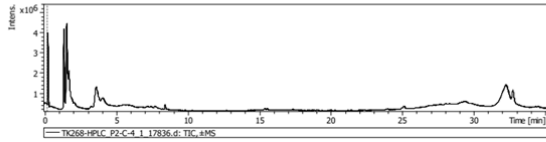
$[M-H]^-$ calculated for $C_{19}H_{26}N_7O_{13}P_2$:
622.10

$[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{28}N_7O_{13}P_2$:
624.10

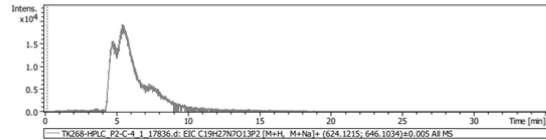
Spectra of peaks:



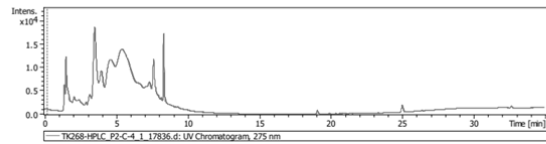
TIC:



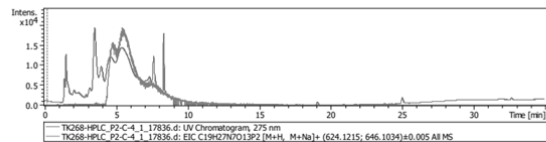
EIC:



UV-Chromatogram:



EIC und UV:



Mass spectrum

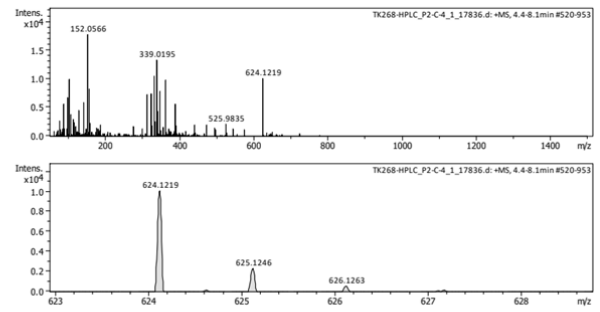
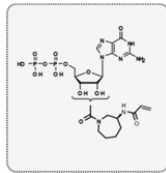
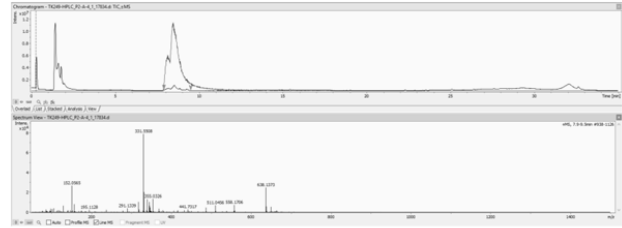


Abbildung 94. HRMS-Spektrum von 15c. $[M+H]^+$ mit $-0,6$ ppm Abweichung. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.

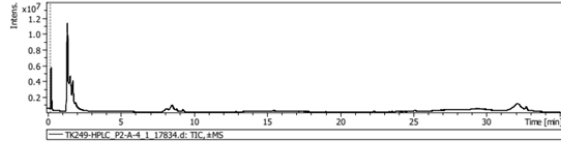


[M-H]⁻ calculated for C₂₀H₂₈N₇O₁₃P₂⁻:
636.10
[M+H]⁺ calculated for C₂₀H₃₀N₇O₁₃P₂⁺:
638.10

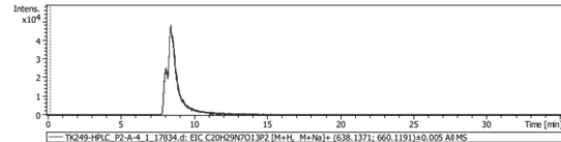
Spectra of peaks:



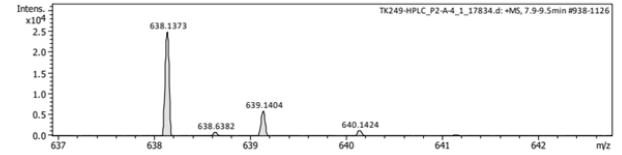
TIC:



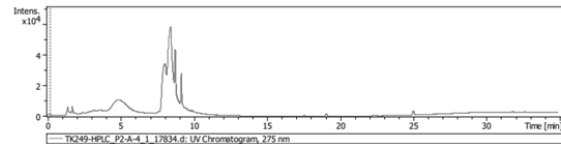
EIC:



Mass spectrum



UV-Chromatogram:



EIC und UV:

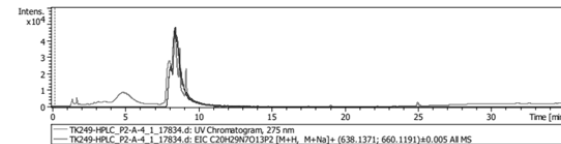


Abbildung 95. HRMS-Spektrum von 15d. [M+H]⁺ mit -0,2 ppm Abweichung; Überlappung mit einer weiteren Masse. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

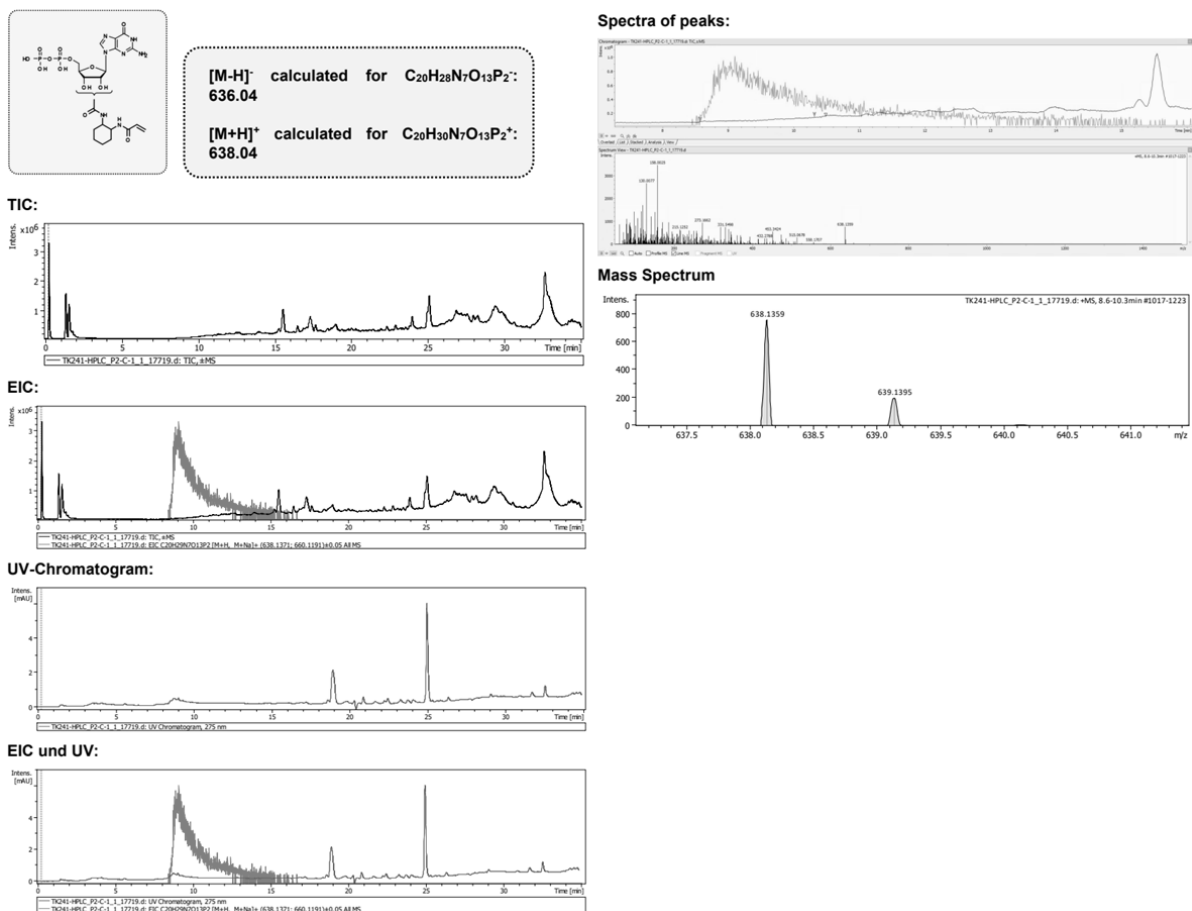


Abbildung 96. HRMS-Spektrum von 15e. [M+H]⁺ mit -1,9 ppm Abweichung. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.

NMR-Spektren

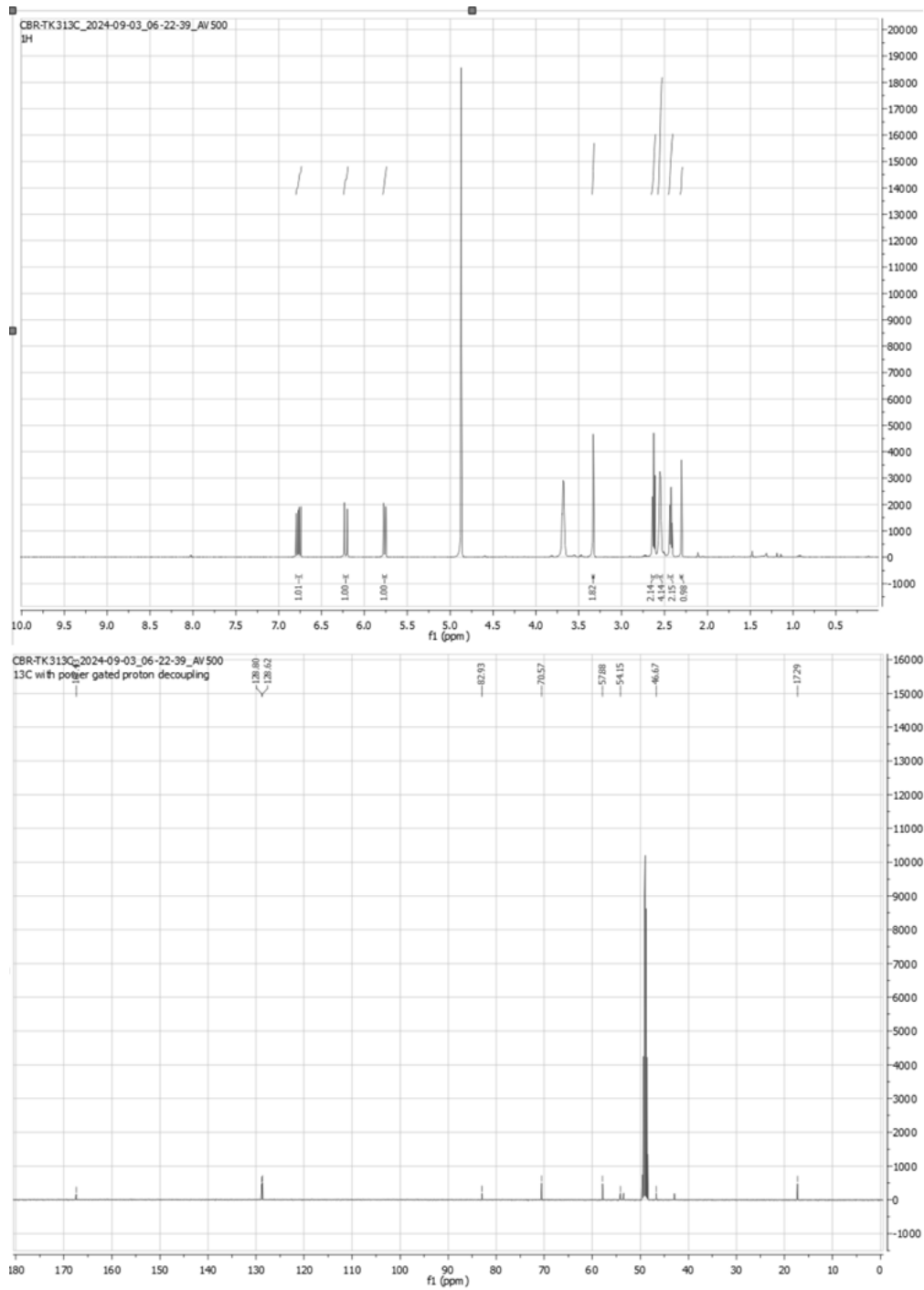


Abbildung 97. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 5 in dem deuterierten Lösungsmittel MeOD.

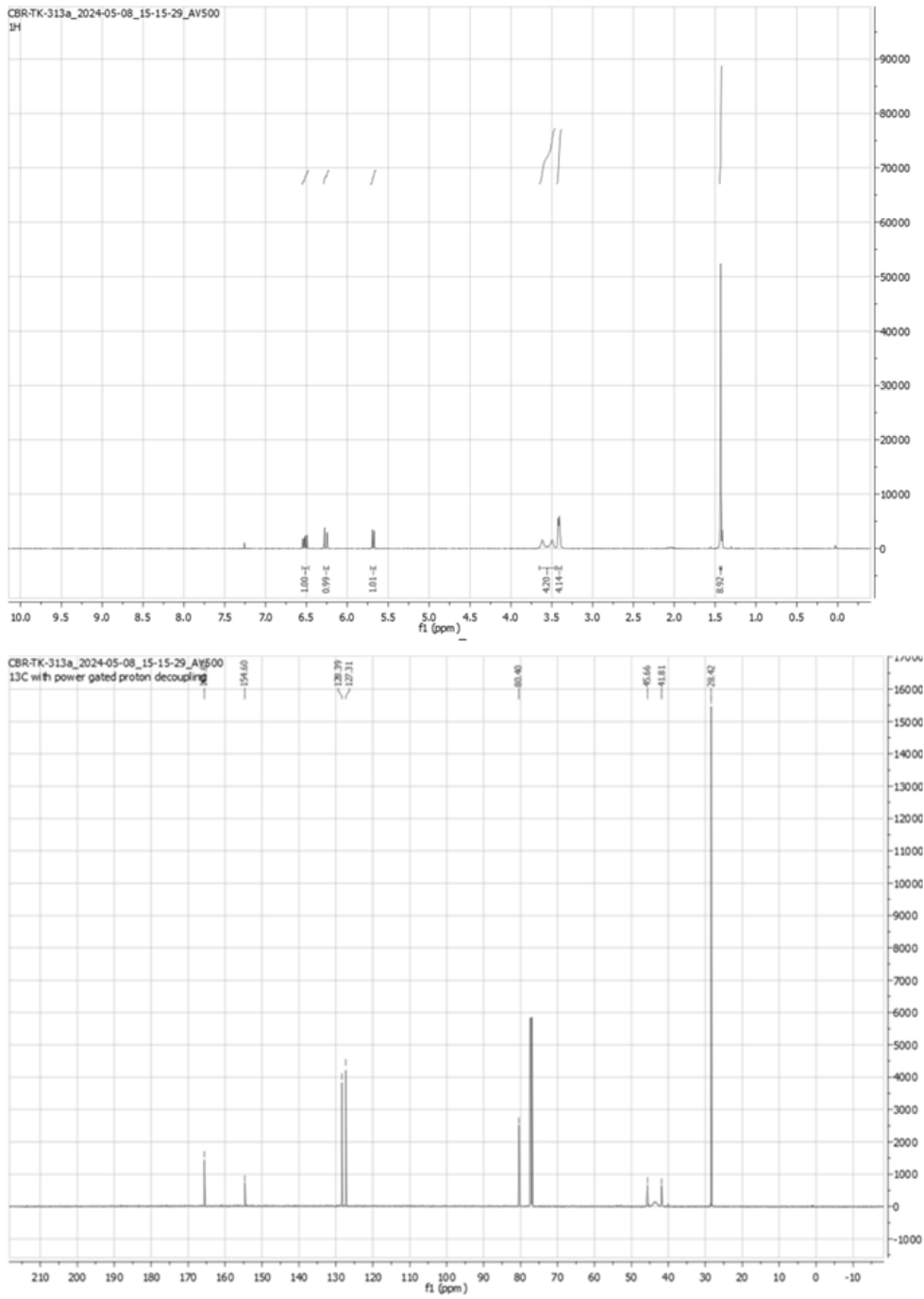


Abbildung 98. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 8 in dem deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 .

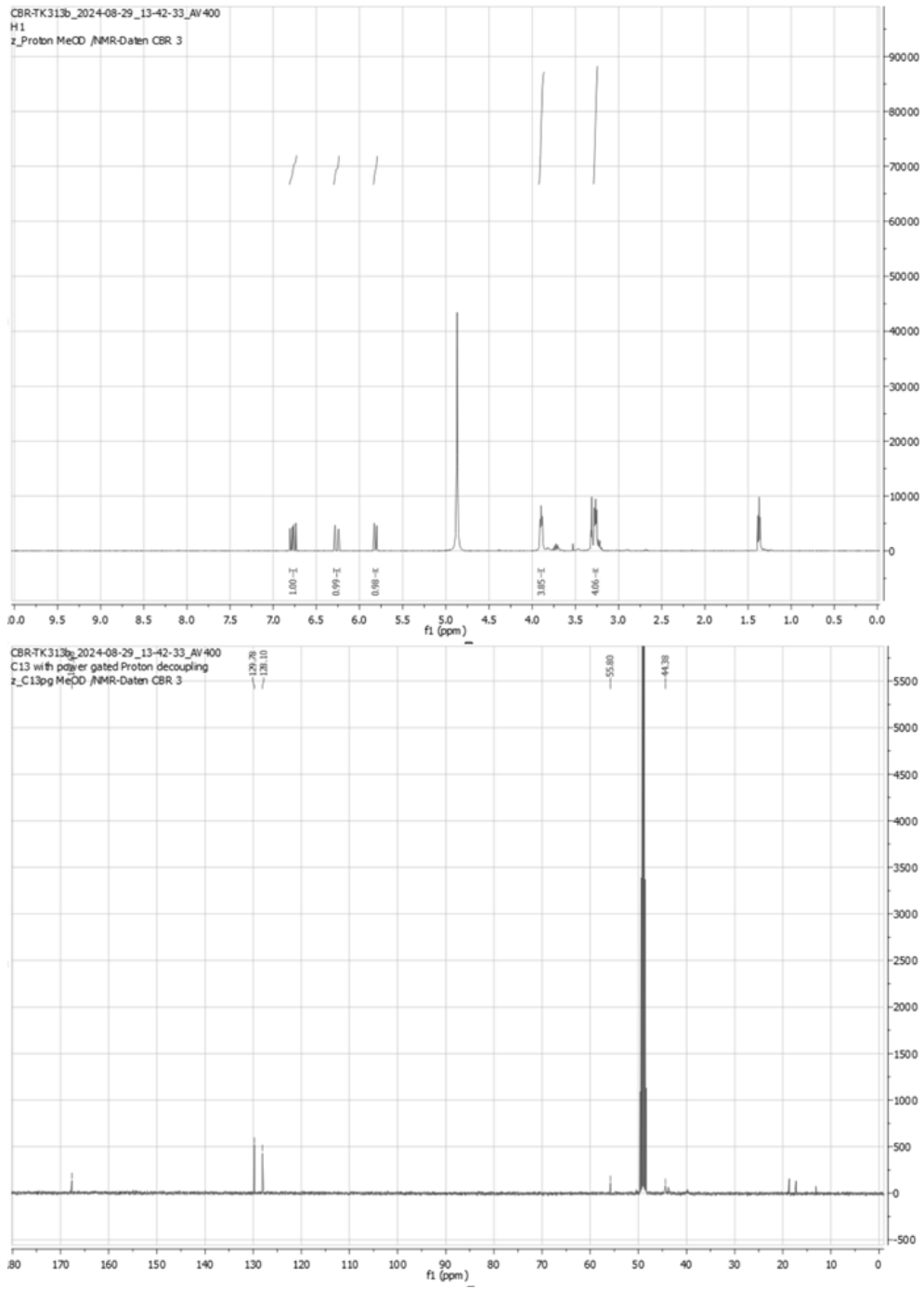


Abbildung 99. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 9 in dem deuterierten Lösungsmittel MeOD.

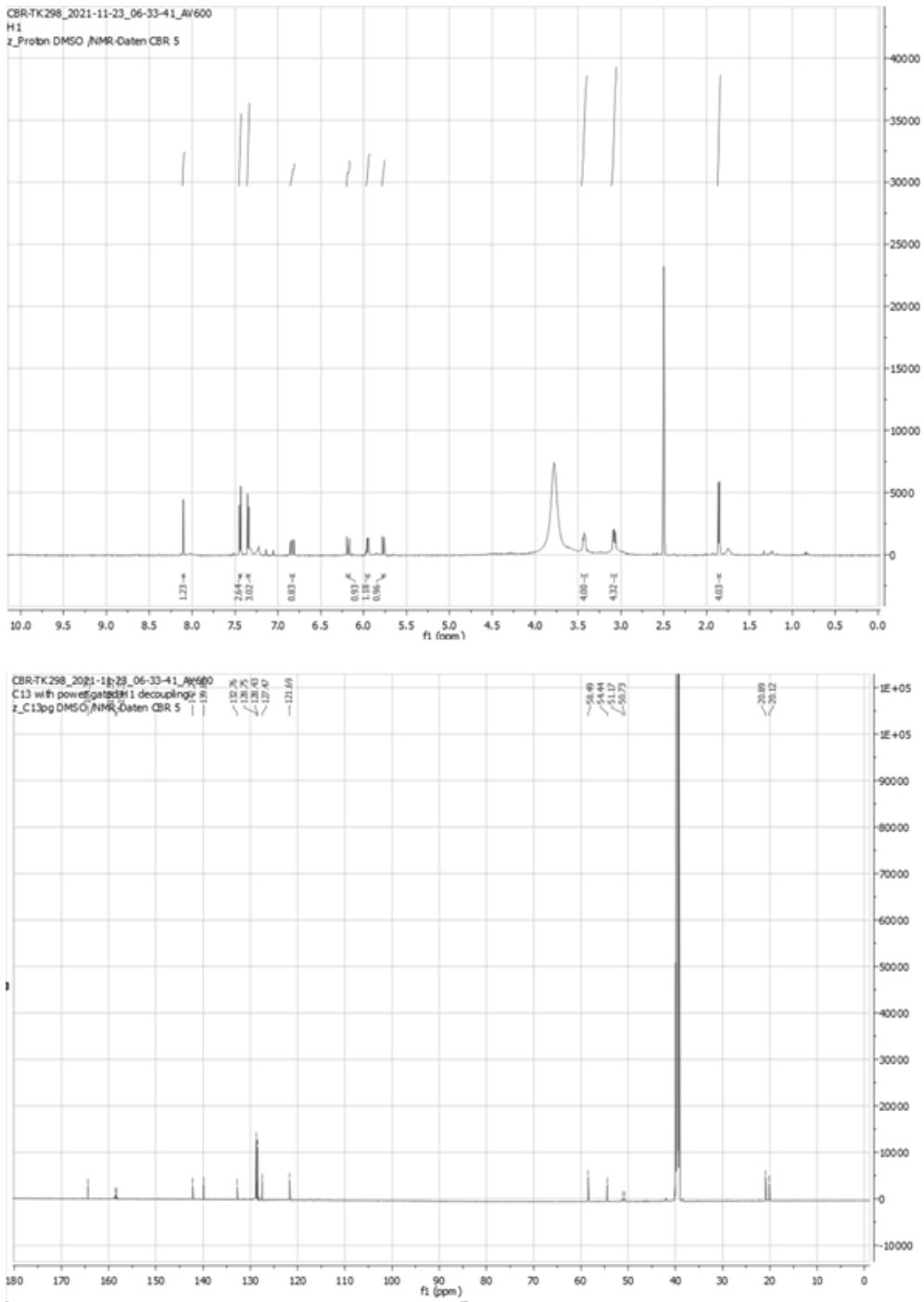


Abbildung 100. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 6a in dem deuterierten Lösungsmittel DMSO.

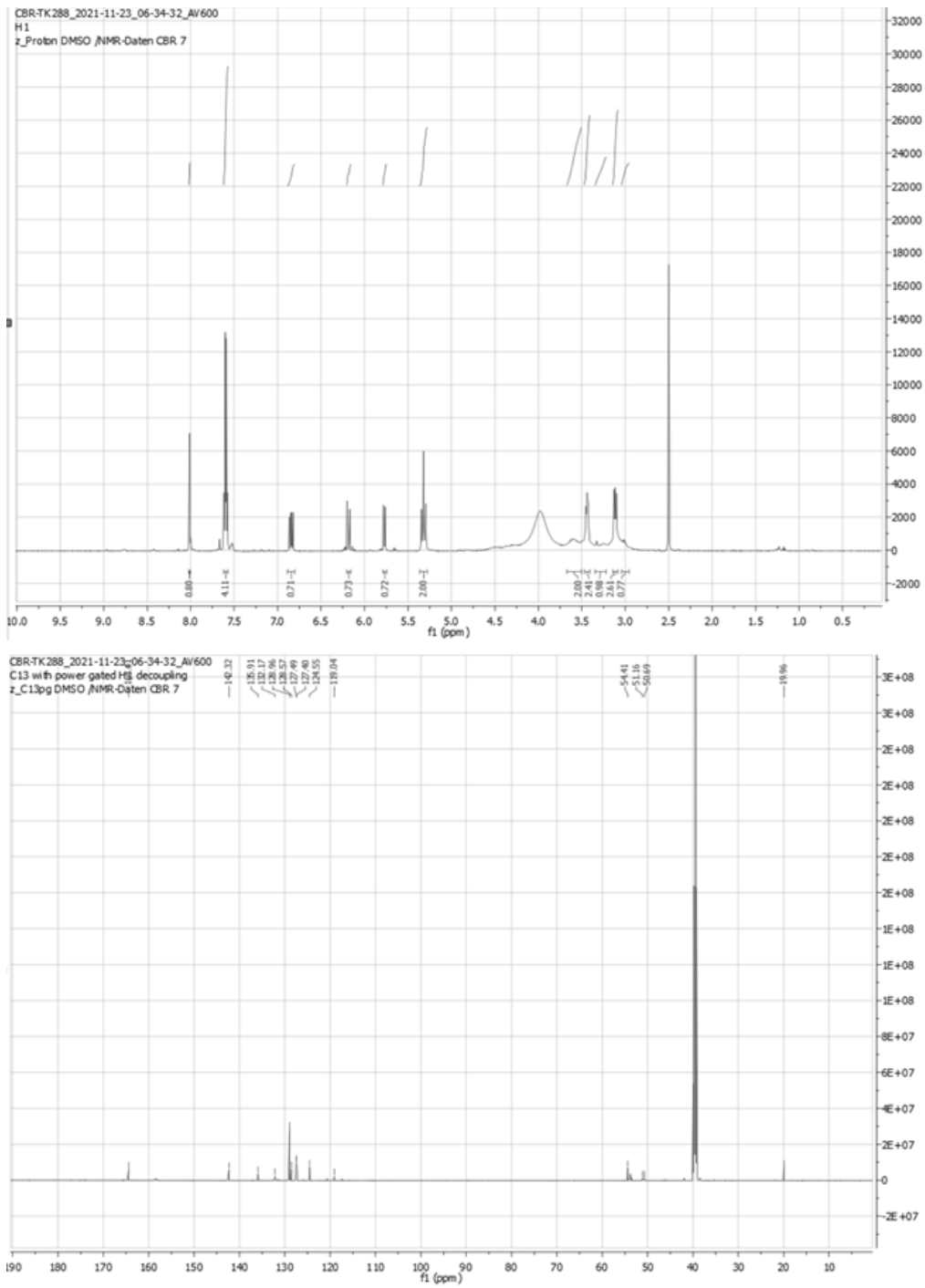


Abbildung 102. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 6c in dem deuterierten Lösungsmittel DMSO.

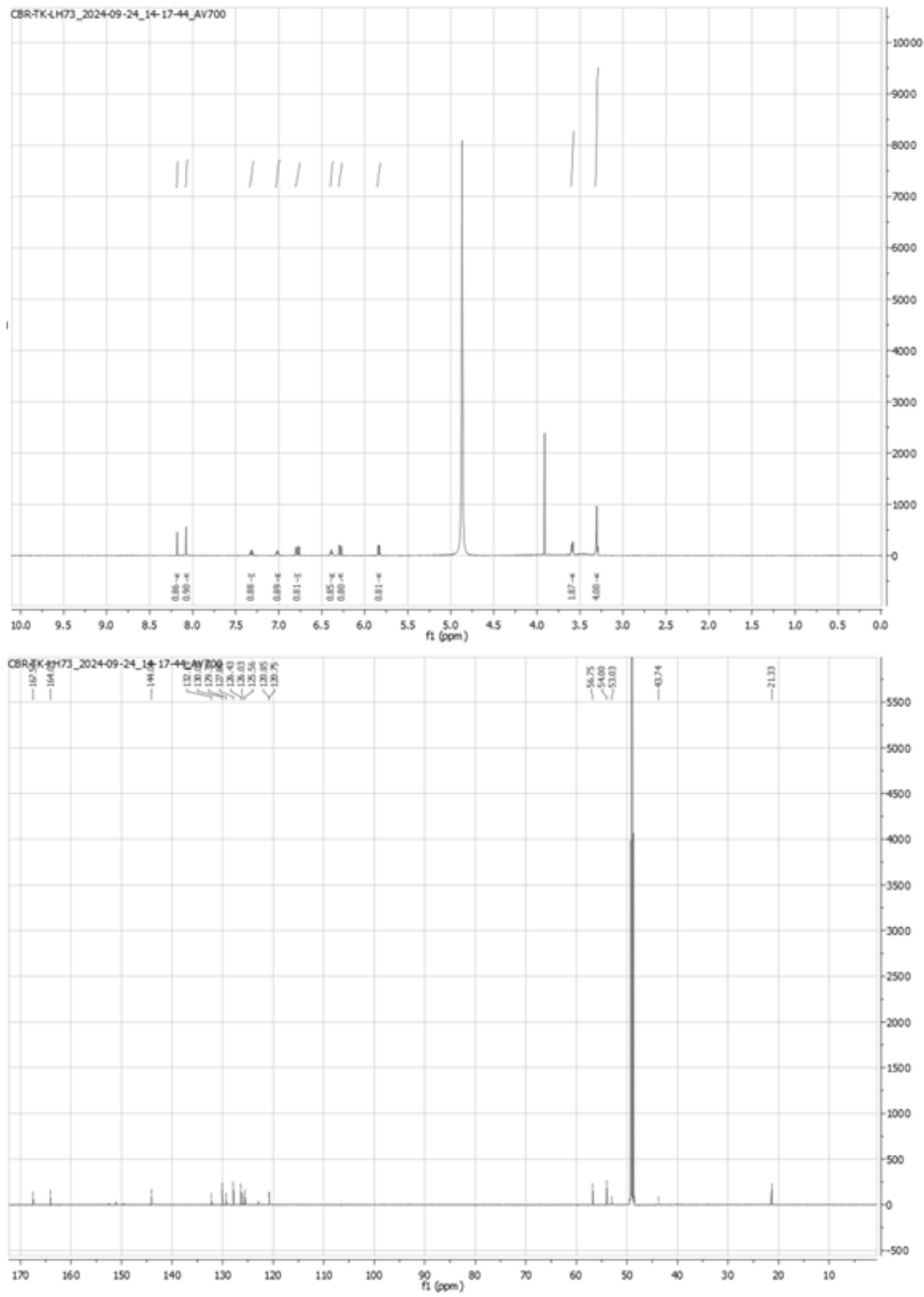


Abbildung 103. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 6d in dem deuterierten Lösungsmittel DMSO.

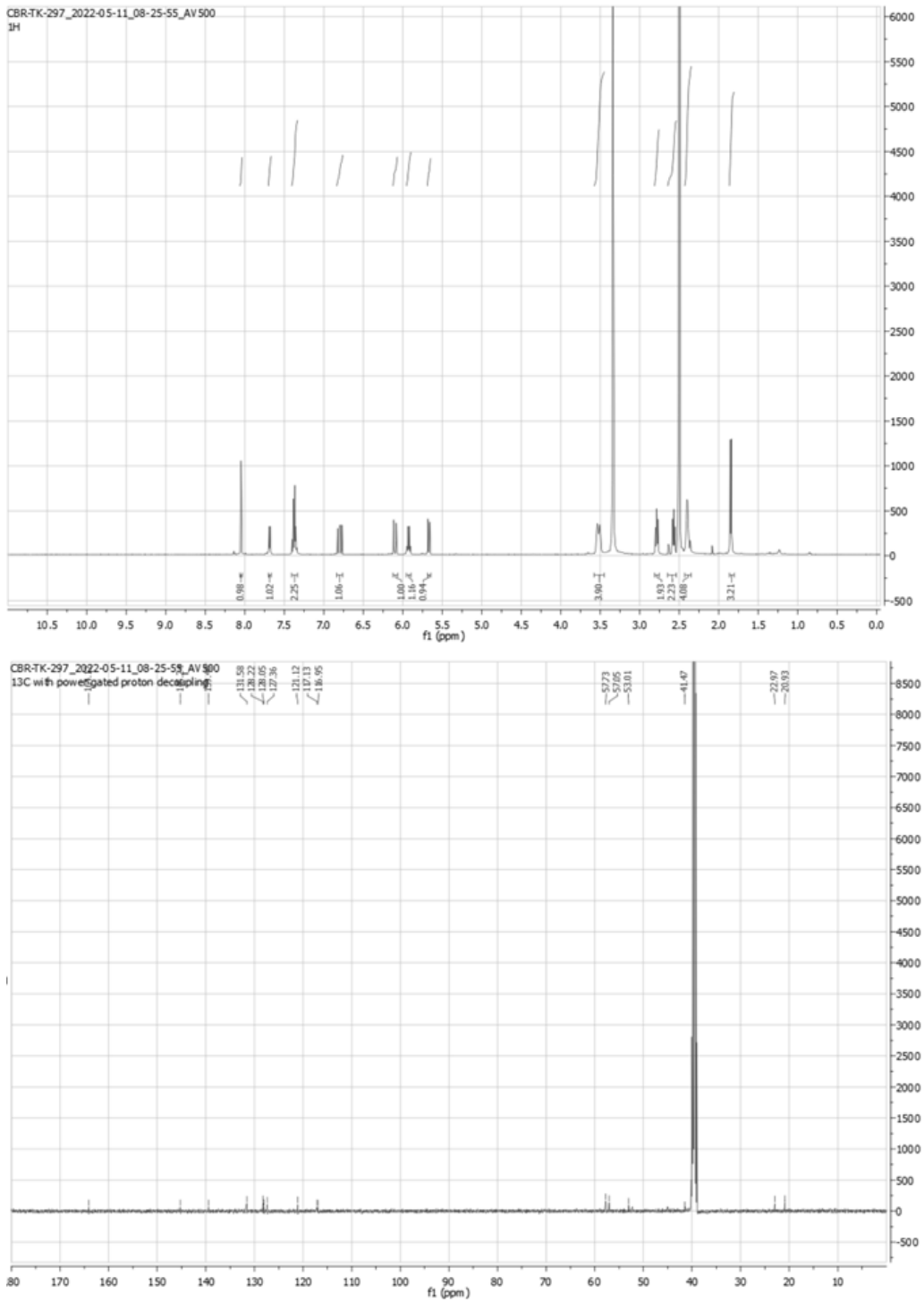


Abbildung 104. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 6e in dem deuterierten Lösungsmittel DMSO.

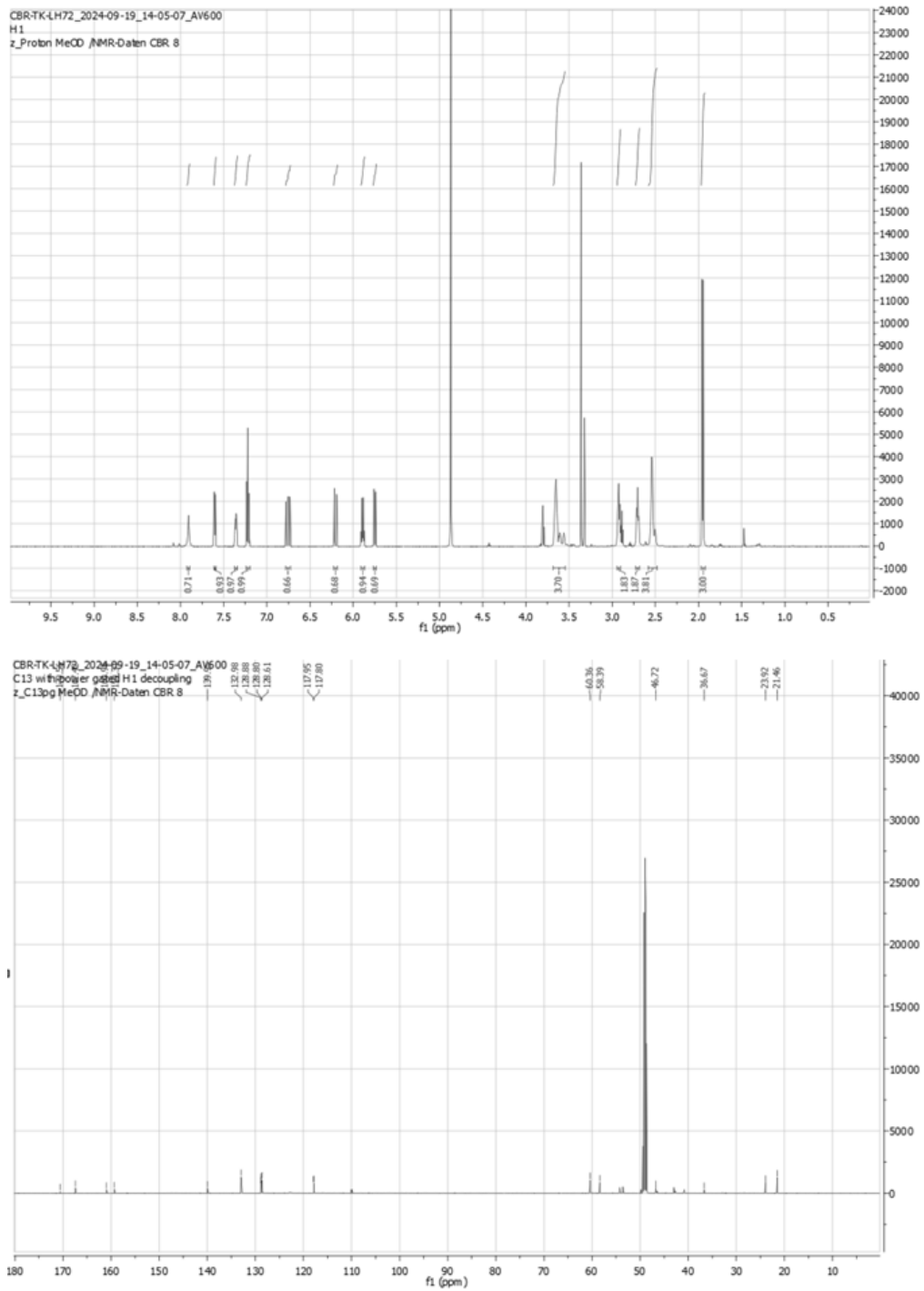


Abbildung 105. ^1H und ^{13}C NMR-Spektrum von 6f in dem deuterierten Lösungsmittel MeOD.

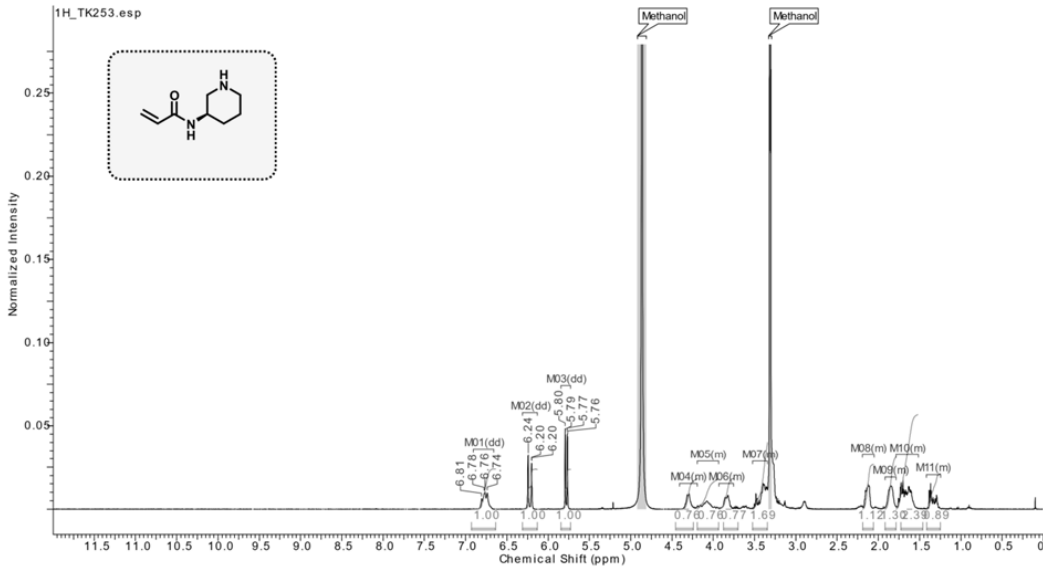
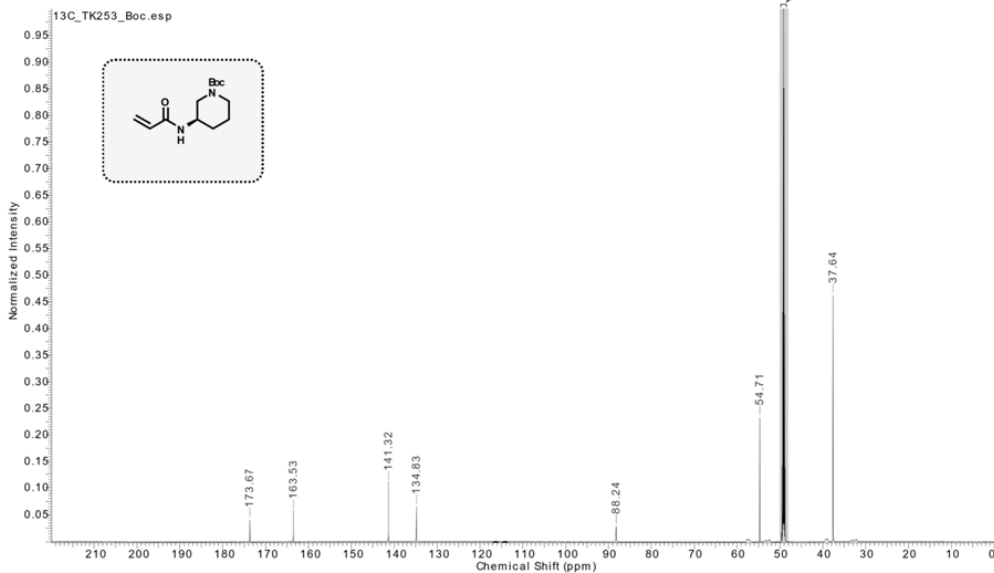
¹H NMR (400 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (175 MHz) in CD₃OD

Abbildung 106. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12b. Aufgrund der niedrigen Konzentration der NMR-Probe war das Signal-Rausch-Verhältnis unzureichend, um ein verlässliches ¹³C-NMR-Spektrum von Amin 12b zu erhalten. Daher wird nur das ¹³C-NMR-Spektrum des Boc-geschützten Vorläufers gezeigt. Die ¹H-NMR-Signale von Amin 12b stimmen jedoch mit denen des entsprechenden (S)-Enantiomers von Amin 12c überein. Es kann daher mit hoher Sicherheit geschlossen werden, dass das gewünschte Produkt erhalten wurde. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.

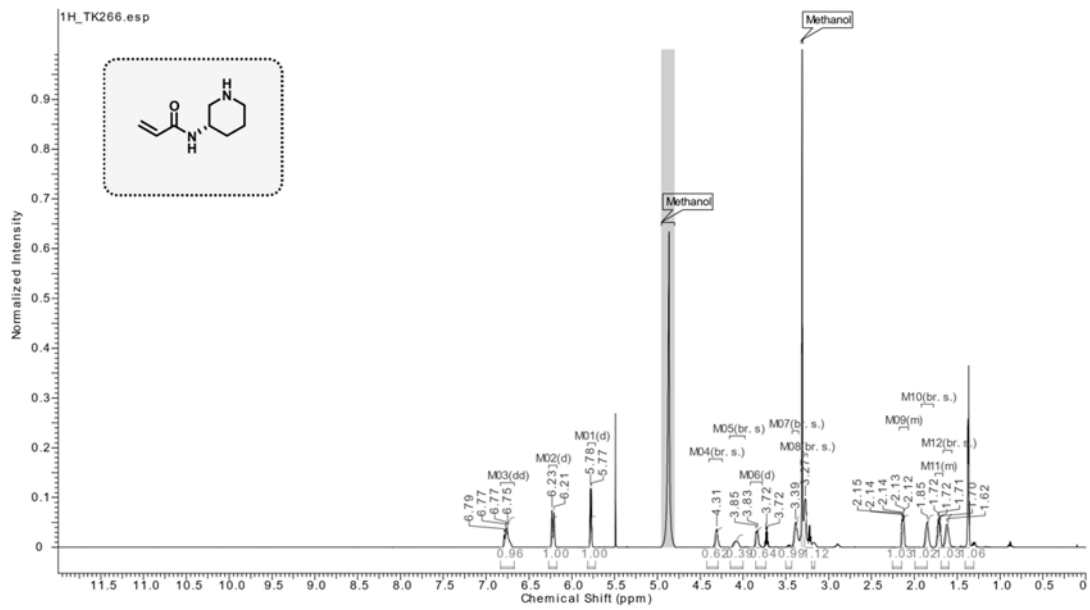
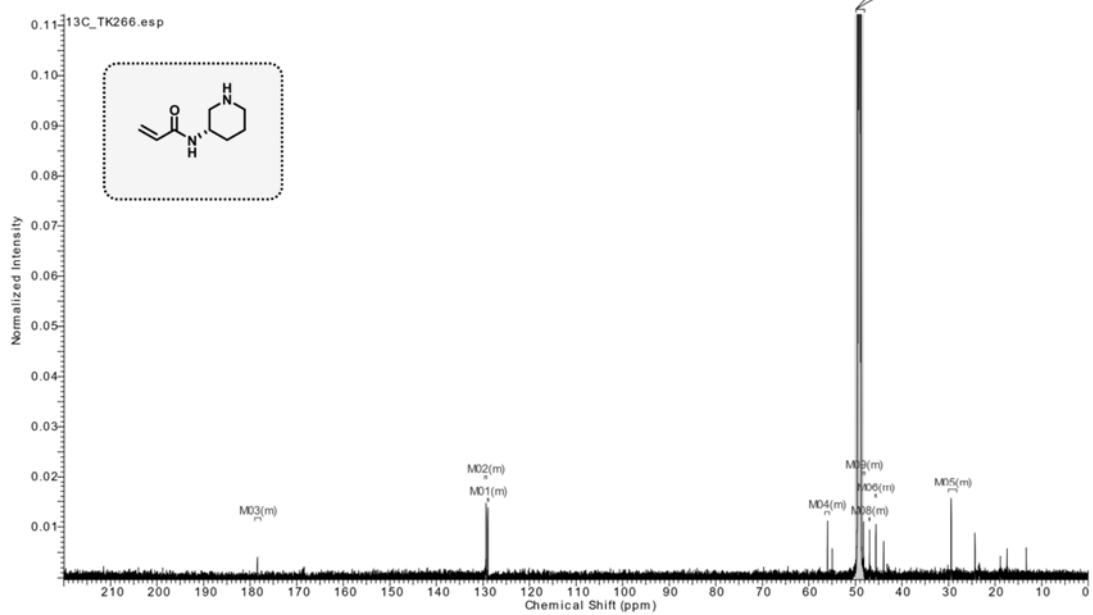
¹H NMR (700 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (175 MHz) in CD₃OD

Abbildung 107. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12c. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

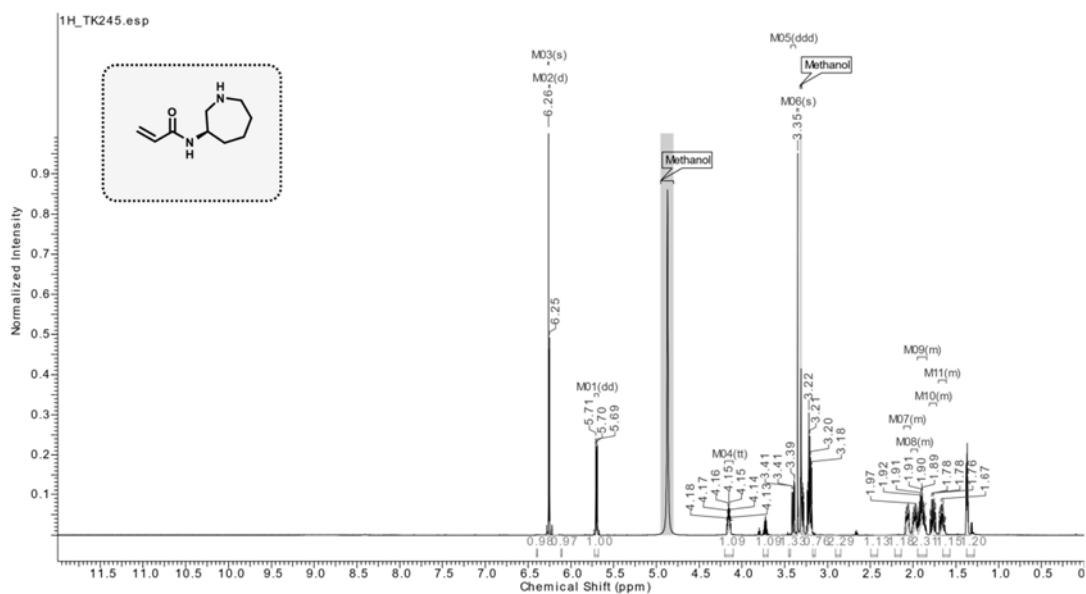
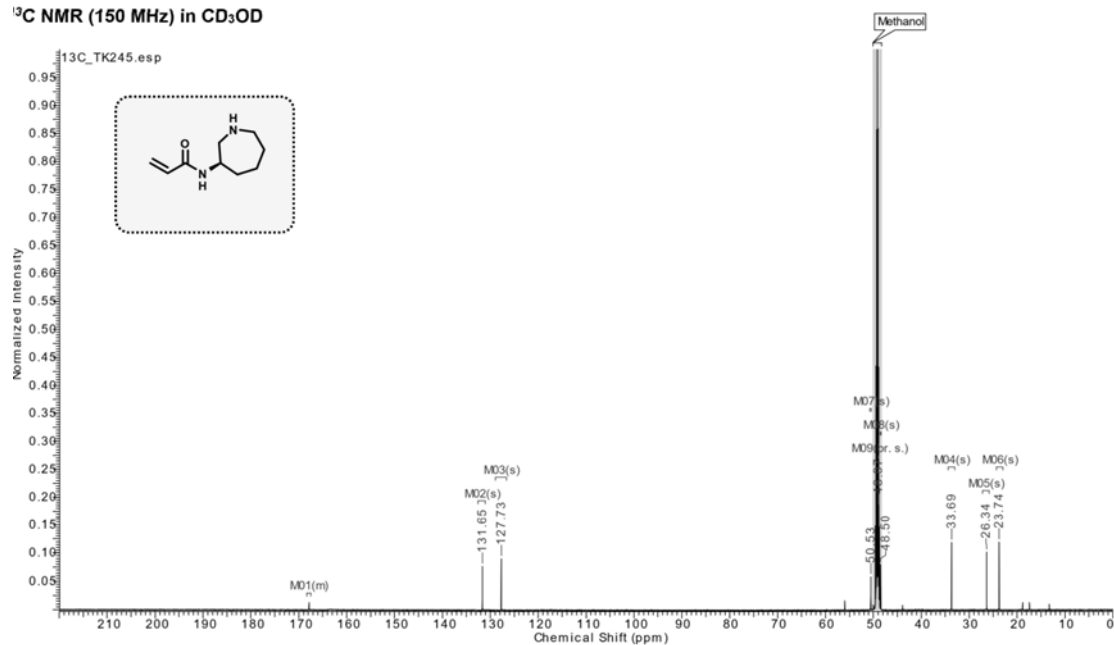
¹H NMR (600 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (150 MHz) in CD₃OD

Abbildung 108. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12d. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt. ¹⁸¹

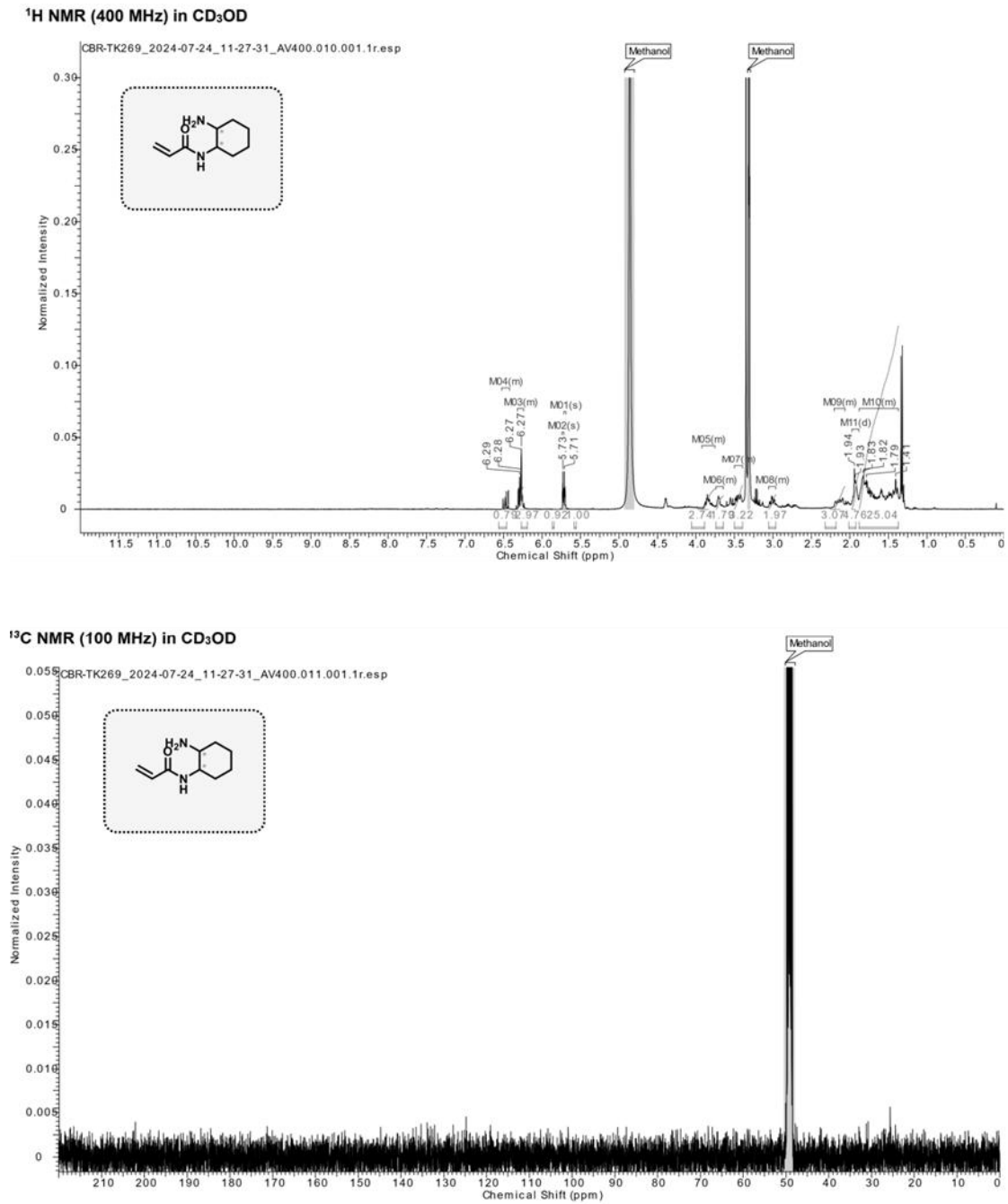


Abbildung 109. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12e. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

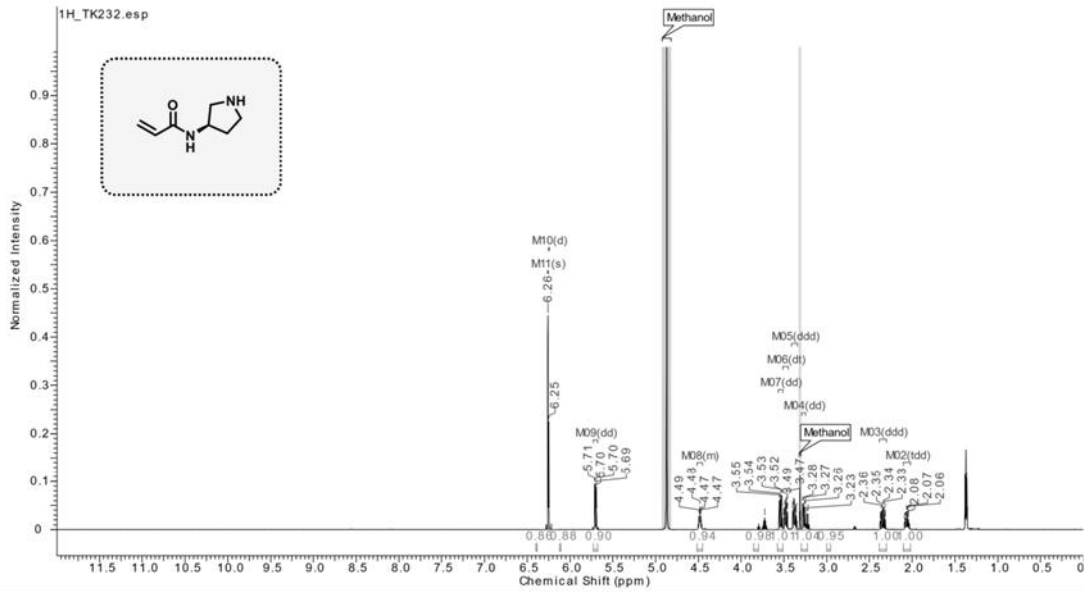
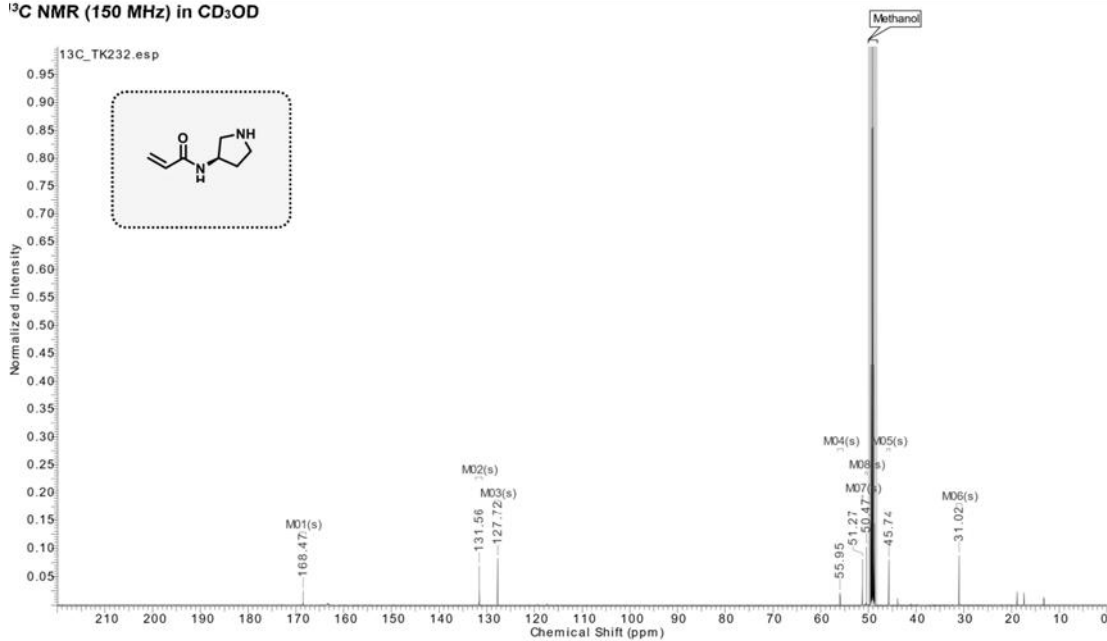
¹H NMR (600 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (150 MHz) in CD₃OD

Abbildung 110. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12f. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

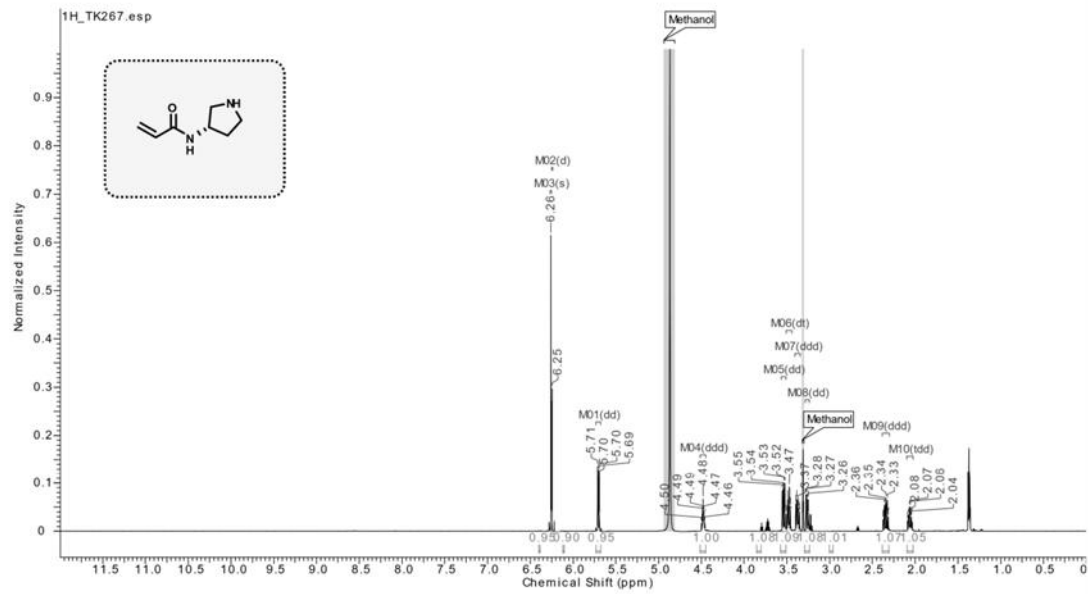
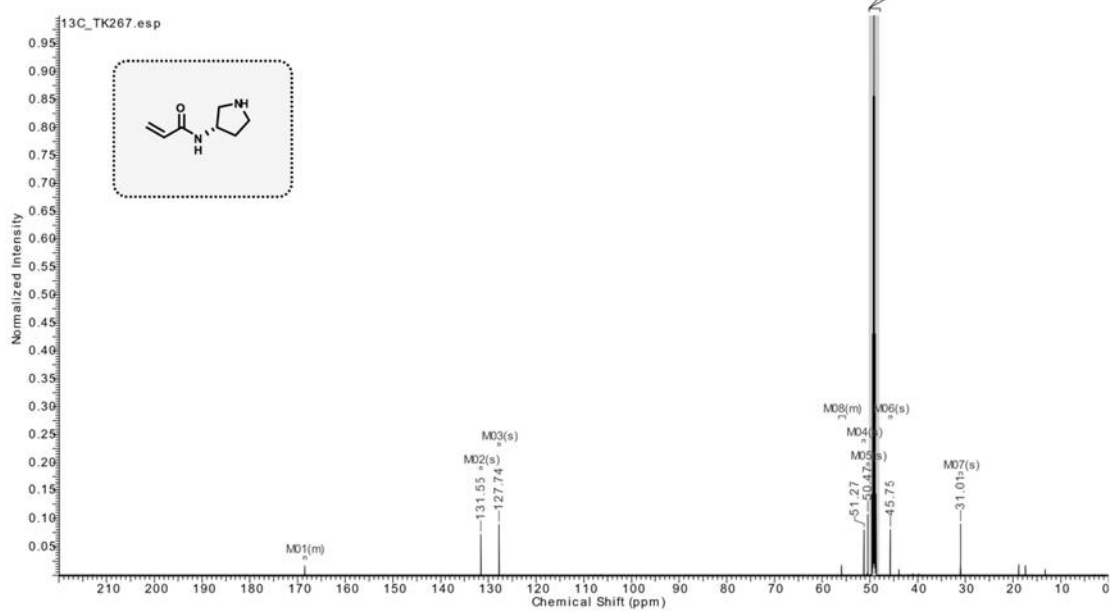
¹H NMR (600 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (150 MHz) in CD₃OD

Abbildung 111. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12g. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

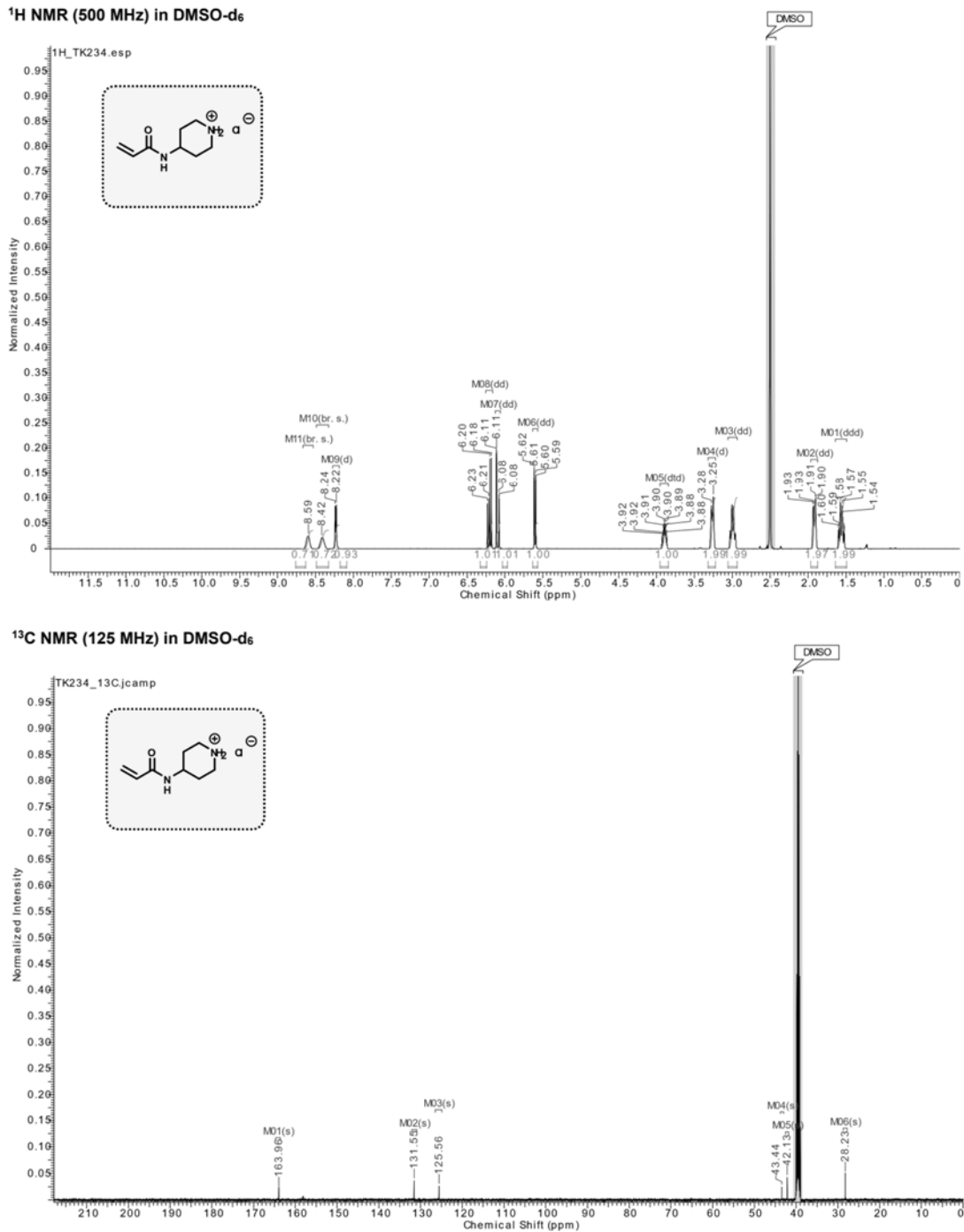


Abbildung 112. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12h. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER et. al.. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

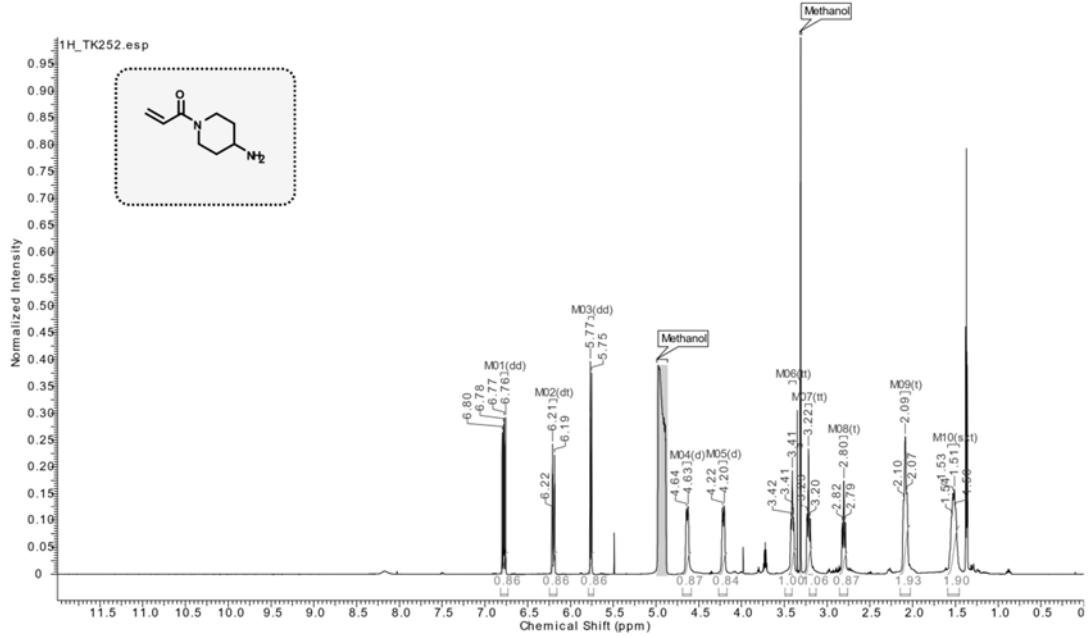
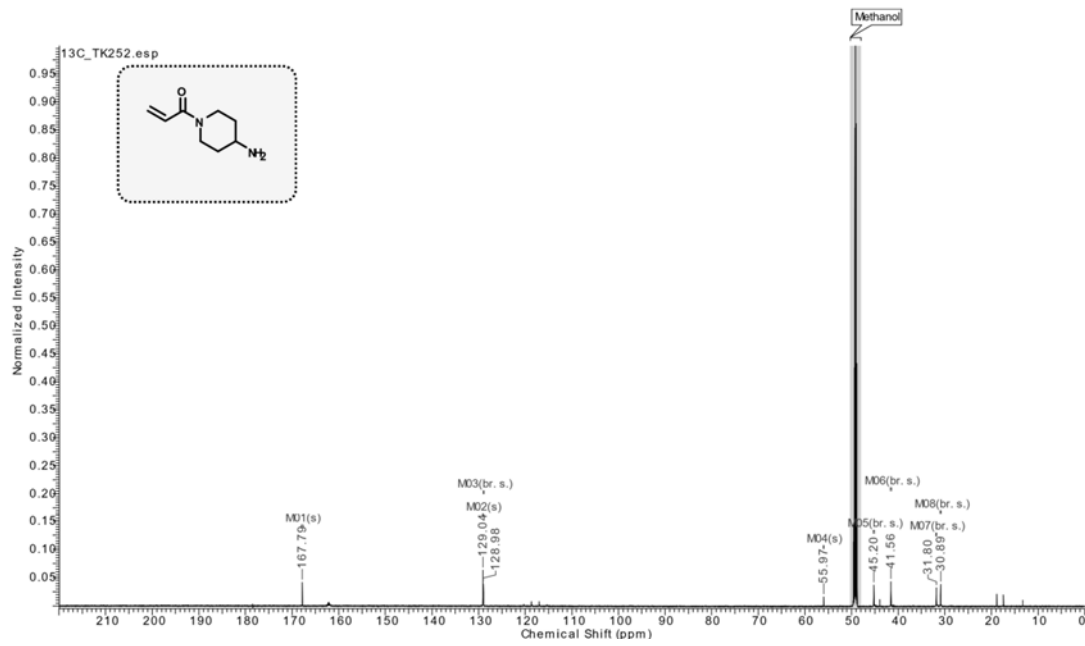
¹H NMR (600 MHz) in CD₃OD¹³C NMR (150 MHz) in CD₃OD

Abbildung 113. ¹H und ¹³C NMR-Spektrum von 12i. Abbildung adaptiert aus KIRSCHNER *et. al.*. Die Analyse des Spektrums sowie die Darstellung wurde von Dr. Jonas Warmuth durchgeführt.¹⁸¹

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Kirschner, Tonia

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Innovative Strategien zur Entwicklung von KRASG12C- und

KRASG13C-Inhibitoren:

Vom Screening zum rationalen Wirkstoffdesign

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)