

# Allélspecifikus inhibitorok nyomában: a RASopátia konzorcium célpontjában a KRAS fehérje onkogén mutációi

NYÍRI KINGA<sup>1,2</sup>, KOPPÁNY GERGELY<sup>1,2</sup>, PÁLFY GYULA<sup>4</sup>, VIDA ISTVÁN<sup>4</sup>, TÓTH SZILÁRD<sup>2</sup>, ORGOVÁN ZOLTÁN<sup>3</sup>, IVAN RANĐELOVIĆ<sup>6</sup>, BARANYI MARCELL<sup>7</sup>, MOLNÁR ESZTER<sup>7</sup>, KESERŰ GYÖRGY MIKLÓS<sup>3</sup>, TÓVÁRI JÓZSEF<sup>5</sup>, PERCZEL ANDRÁS<sup>4,5</sup>, VÉRTESSY G. BEÁTA<sup>1,2</sup>, TÍMÁR JÓZSEF<sup>7</sup>

<sup>1</sup>BME Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék; Természettudományi Kutatóközpont, <sup>2</sup>Enzimológiai Intézet, <sup>3</sup>Gyógyszerkémiai Kutatócsoport; ELTE Kémiai Intézet, <sup>4</sup>Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, <sup>5</sup>MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport, <sup>6</sup>KINETO Lab Kft., <sup>7</sup>Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest

## Levelezési cím:

Prof. dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest, Üllői út 91. E-mail: jtimar@gmail.com

## Közlésre érkezett:

2019. november 24.

## Elfogadva:

2019. november 25.

Az NVKP pályázati konstrukció keretében 2017-ben kezdte meg közös munkáját a Semmelweis Egyetem, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, az Eötvös Loránd Tudományegyetem és két innovatív vállalkozás, a KINETO Lab Kft. és a Fototronic Kft. Fő célkitűzésünk az emberi rosszindulatú daganatokban nagy gyakorisággal károsodott KRAS fehérje onkogén mutánsainak célzott támadása, allélspecifikus inhibitorok fejlesztése. Az emberi RAS fehérje és annak izoformái (HRAS, KRAS) kiemelkedő szerepet játszanak a jelátvitelben, helyes működésük az életképesség fenntartásához elengedhetetlen, egyes pontmutációik azonban a jelpálya túlzott erősítését váltják ki, ami tumorok képződését okozza. Kidolgoztuk a KRAS G12C mutáns fehérjét expresszáló bakteriális rendszert, homo- és heterozigóta emberi tüdő-, vastagbél- és pankreászrák-sejtvonalakat. Potenciális új inhibitor tervezéséhez kovalens fragmens és akrilamid-fej könyvtárakat használtunk. Referenciaként a jelenlegi legjobb kovalens inhibitorokat használva számos új gyógyszerjelölt kismolekulájú inhibitorot azonosítottunk, amelyek G12C KRAS- és daganatsejt-specifikusnak bizonyultak. *Magy Onkol* 63:310-319, 2019

**Kulcsszavak:** KRAS, G12C mutáció, allélspecifikus inhibitor, *in vitro*, *in vivo* tesztelés

*The RASopathy consortium was built from research groups of the Budapest University of Technology and Economics, Eötvös Loránd University, Semmelweis University and two startups: KINETO Lab Ltd. and Fototronic Ltd. The goal was to design and test novel covalent and allele-specific KRAS small molecular inhibitors. KRAS is the most frequently mutated human oncogene which was unsuccessfully targeted until recently. The consortium established G12C-expressing bacterial and human cancer cell models (homo- and heterozygous variants) of lung, colorectal and pancreatic tumors. Using covalent fragment and acrylamide warhead libraries we were able to select novel candidates of small molecular G12C-specific inhibitors which were compared to published best-in-class drug candidates.*

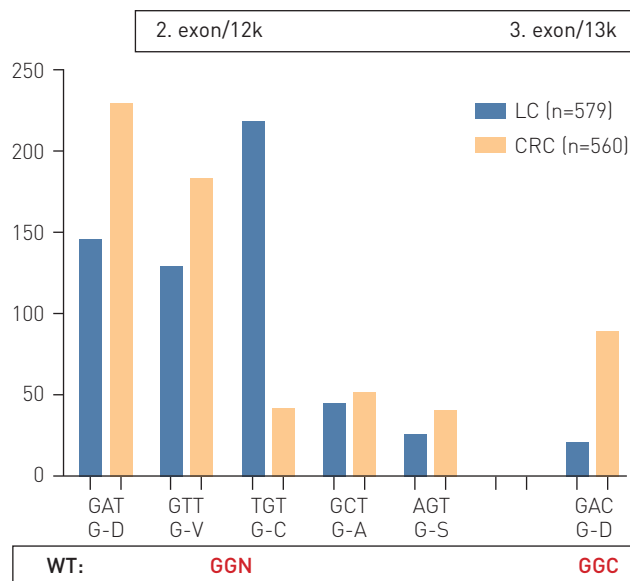
*Nyíri K, Koppány G, Pálffy G, Vida I, Tóth S, Orgován Z, Randelović I, Baranyi M, Molnár E, Keserű GM, Tóvári J, Perczel A, Tímár J, Vértessy GB. Allele-specific inhibitors of mutant KRAS are in the focus of RASopathy consortium. *Magy Onkol* 63:310-319, 2019*

**Keywords:** KRAS, G12C mutation, allele-specific inhibitor, *in vitro*, *in vivo* testing

## BEVEZETÉS

A RAS a leggyakrabban mutált onkogén az emberi daganatokban. A 3 izoforma közül a leggyakrabban érintett a KRAS, ezt követi az NRAS, míg a HRAS sokkal ritkábban mutált. Maga a RAS fehérje egy kisméretű GTP-áz, amely ennek megfelelően GTP-t és GDP-t képes megkötni: a GTP-kötött forma az aktív állapot. A RAS onkogén a növekedési faktor receptor jelpályák fontos átkapcsoló, jelerősítő és azt diverzifikáló eleme, amely igen komplex pozitív és negatív szabályozás alatt áll (*kiegészítő 1. ábra; a kiegészítő táblázatok és ábrák az online változatban tekinthetők meg*). Ez is magyarázza azt, hogy miért oly gyakran érintett funkciója az emberi daganatokban. A KRAS-mutáció a leggyakoribb hasnyálmirigyrákokban (>80%), míg a tüdő adenokarcinómáiban (1) és a vastagbélrákokban (2) 30-30%-os a gyakorisága. A tüdőrákokban a RAS-mutáció okozója a dohányzás, míg a hasnyálmirigyrákokban és vastagbélrákokban minden bizonnyal más (elsősorban táplálkozási eredetű) kémiai karcinogének is szerepet játszhatnak. Az NRAS-mutáció sokkal ritkábban (~10%) fordul elő a különféle daganatokban, mint a melanóma, pajzsmirigyrák, vastagbélrák; melanóma esetében az UV-sugárzás, míg a többi daganat esetében más kémiai karcinogének felelősek a mutációkért. Kimutattuk, hogy a RAS-mutáció általában kedvezőtlen prognosztikus faktor [1, 3], de bizonyos célzott kezelések szempontjából (angiogenezis-gátlás) negatív prediktív faktor is tüdőrákokban [3].

Az onkológia fejlődésének hatalmas lökést adott az, hogy egyrészt megismertük a különféle daganatokban mutált onkogéneket, amelyek döntő többsége tirozinkináz aktivitású, másrészt ezekkel szemben számos kiváló inhibitorot sikerült előállítani, amelyek jelentős része klinikailag is hatékony volt, így elérhetővé vált a rosszindulatú daganatok célzott terápiája. Jogos volt az a várakozás, hogy hasonló sikereket lehet elérni a RAS-mutált daganatok esetében is. Míg azonban a tirozinkináz onkogének gátlását ATP-analógokkal lehetett elérni, hasonló megközelítés a RAS esetében GTP-analógokkal nem járt sikerrel, ami miatt a RAS fehérjét „non-druggable”-nek, támadhatatlannak nyilvánították, és hosszú évtizedekre kikerült a fejlesztési portfóliókból. Ez a helyzet azonban az elmúlt években megváltozott, elsősorban azért, mert az NCI-NIH kiemelt projektet kezdeményezett a mutáns RAS inhibitorainak kifejlesztésére, amit a holdra szállás céljának kitűzéséhez hasonlított [4]. A hatalmas anyagi és szellemi erőfeszítések mára beérni látszanak, mivel az első mutáns-KRAS-inhibitorral megkezdődtek a fázis I-II-es vizsgálatok, és több új vegyület is elérte vagy hamarosan eléri a klinikai fázist (*kiegészítő 1. táblázat*). Az új megközelítés a mutáns-specifikus irreverzibilis KRAS-gátló szer kidolgozása volt, ahol is először a leggyakrabban érintett KRAS exon 2 kodon G12C mutáns lett a célpont. Ez a típusú mutáció azonban csak a tüdőrákokban a leggyakoribb, más RAS-mutáns daganatokban sokkal ritkább, azokban a G12 kodon D, illetve V mutációi a gyakoriak (*1. ábra*), amelyek esetében a kémiai tervezés lehetőségei sokkal bonyolultabbak. A RASopátia Konzorcium megalaku-



1. **ÁBRA.** KRAS-mutáns allél gyakorisága tüdő- és vastagbélrákban (SE II. Sz. Patológiai Intézet molekuláris diagnosztikai anyaga; CRC: vastagbélrák, k: kodon, LC: tüdő-adenokarcinóma)

lásakor gondosan elemeztük a korábbi gyógyszerfejlesztési próbálkozások sikertelenségeinek okait és azokat az alábbiakban határoztuk meg: 1: A (K)RAS működéséről, illetve funkciózavarairól túl sok dogma, de kevesebb evidencia áll rendelkezésre (mint például a GTP-áz funkció elvesztése). 2: Nem vesszük figyelembe azt a tényt, hogy a mutált (K)RAS a daganatokban a leggyakrabban heterozigóta formában, tehát a vad típusú génnel együtt fordul elő, amelyet azonban nem lehet, nem szabad blokkolni, mert vitális fontosságú a funkciója. 3: A KRAS-nak több, úgynevezett hasítási variánsa van, és nem igaz az a dogma sem, hogy a daganatokban vagy emberben csak a 4B forma fejeződik ki. 4: Az eddig ismert 3D fehérjeszerkezetek az inhibitorok molekuláris felismeréséért felelős régiókban sok esetben pontatlanok.

## PREKONCEPCIÓ: TANULNI MÁSKÁRÁN

A KRAS G12C onkogén mutáns fehérje elleni hatóanyag fejlesztésének kulcspontja a cisztein aminosavra irányított kovalens inhibitorok tervezése. Elsőként Ostrem és kutatócsoportja 2013-ban fejlesztett ki olyan inhibitorokat (8-as és 12-es), amelyek kovalens kötést létesítettek a mutáns ciszteinnel. Ezek a molekulák a KRAS úgynevezett switch-II régiója alatt található S11 P zsebbe illeszkednek, amely kötőzseb a kovalens inhibitorokat nem tartalmazó szerkezetekben nincs jelen, csak az inhibitor jelenlétének hatására alakul ki. A 8-as és 12-es molekulák megközelítőleg tizedére csökkentik a KRAS G12C affinitását GTP-hez, miközben a GDP-hez való kötődést nem gátolják. Emellett csökkentik a KRAS SOS

által katalizált aktivációjának sebességét, így tehát a kóros működést is [5].

Tüdőráksejtvonalakon végzett kísérletek bizonyították ezen inhibitorok specificitását: a KRAS G12C mutáns sejtvonalaknak (H1792, H358, Calu-1 és H23) a 12-es inhibitorral való kezelés hatására csökkent az életképessége és apoptózis indukálódott, míg a mutációt nem tartalmazó úgynevezett vad típusú sejtvonalak (A549, H1299 és H1437) esetében ezt nem vagy csak sokkal kisebb mértékben tapasztalták.

A fenti molekulák azonban proteolízis-MS eredmények alapján bizonyítottan csak kis mértékben (6 óra után 100  $\mu\text{M}$ -os koncentráció mellett kevesebb mint 20%) kapcsolódtak a KRAS-hoz H358 sejtekben, ezért optimalizálták az inhibitorvázat és reaktív csoportot összekötő linkerrégiót, az így kapott inhibitorjelölt (ARS-107) vázán egy klóratomot kicseréltek az apoláris metil-ciklopropil-csoportra [6]. Az így kapott ARS-853 molekula a 12-es vegyülethez képest több mint 600-szoros sebességgel kapcsolódik a KRAS G12C ciszteinjéhez. Az ARS-853 a többi kovalens inhibitorhoz hasonlóan a fent bemutatott S11-P zsebbe illeszkedik: az aromás gyűrű, valamint a metil-ciklopropil-csoport és a klóratom szoros van der Waals kölcsönhatásba lép a zseb hidrophil részével, míg a hidroxil- és a karboxilcsoport hidrogénhidakat képez az Asp69 és Lys16 aminosavakkal, ezáltal a fehérje az aktív formától eltérő, stabil konformációt vesz fel. Az ARS-853 gyorsan reagál a KRAS G12C GDP-kötött formájával, a GTP-kötött aktív formához nem képes hozzákötni, valamint gátolja a nukleotidkicserélődést, ami konzisztens azzal a feltételezéssel, hogy az inhibitor és a GTP kölcsönösen gátolják egymás kapcsolódását a fehérjéhez. Emiatt különösen nagy a jelentősége a G12C mutáns azon tulajdonságának, hogy saját GTP-áz aktivitása összemérhető a vad típuséval ( $k_{\text{cat}}[\text{KRAS}] = 6 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$ ,  $k_{\text{cat}}[\text{KRAS G12C}] = 4,9 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$ ) [7]. Így a KRAS G12C esetében a GTP hidrolízisét követően az inhibitor képes csatlakozni a GDP-kötött fehérjéhez, és irreverzibilisen inaktíválni azt. Ez lehetetlen lenne, ha a KRAS G12C mutáns a klasszikus elképzelésnek megfelelően, saját GTP-áz aktivitás hiányában végérvényesen a GTP-kötött állapotban maradna. Azt, hogy az ARS-853 csak az inaktív GDP-kötött KRAS fehérjével lép reakcióba, alátámasztja az a tény is, hogy ha a KRAS-GTP komplex képződését gátolták (a jelátviteli útvonalban szereplő EGFR fehérje inhibícióján keresztül), akkor a sejtes kísérletekben sokkal gyorsabb volt az ARS-853 és a KRAS G12C kapcsolódása [8]. Háromféle KRAS G12C mutációt tartalmazó humán tüdőrákcarcinóma-sejtvonalon (NCI-H358, Calu-1 és H23) végzett kísérletben az ARS-853 hatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a MEK/ERK útvonalon jelentősen csökken a jeltovábbítás, valamint az élő sejtek száma is csökkent, míg a vad típusú, vagy más KRAS-mutáns fehérjét tartalmazó sejtvonalak esetében az ARS-853 vegyület hatása elhanyagolható mértékű volt [8].

Az ARS-853 *in vivo* modellekben viszont nem bizonyult elég hatékonynak, mivel a plazmában gyorsan bomlik (a féleletideje kevesebb mint 20 perc), valamint orálisan bejuttatva

az inhibitornak kevesebb mint 2%-a jutott el a célfehérjéhez. Janes és munkatársai 2018-ban az ARS-853 vázát átalakítva, egy kinazolingyűrűt beillesztve kifejlesztették az ARS-1620 molekulát, ami amellet, hogy az ARS-853-hoz hasonlóan *in vitro* gátolja a KRAS G12C mutáns GTP-kötött állapotba kerülését, *in vivo* modellekben is hatékonyan gátolta a KRAS G12C sejtek működését [9]. Az ARS-1620 a plazmában stabil, valamint orálisan a modellszervezetbe juttatva az inhibitor több mint 60%-a eljutott a célfehérjéhez. Emellett ez a gyógyszerjelölt hatékonyan csökkentette a tumorigenezishez hozzájáruló fehérjék expresszióját, és apoptotikus folyamatokat indított be KRAS G12C mutáns tumorsejtvonalakon. Az ARS-1620 vizsgálata során kiderült, hogy a daganatsejtek érzékenysége az inhibitorral való kezelésre eltérő *in vitro* és *in vivo* modellek esetén, ugyanis az ARS-1620 nagyobb hatást mutatott az *in vivo* vizsgálatok során [9].

Ezt követően a további optimalizálási lehetőségek felderítése érdekében részletesen jellemezték az inhibitorok kötési mechanizmusát [10]. A kötődés kialakulását egy kétlépéses reakcióval modellezték, amelyben egy reverzibilis és egy irreverzibilis lépés megy végbe. A tapasztalatok szerint ezeknek az inhibitoroknak más kovalens inhibitoroktól (pl. EGFR-gátlók) eltérően a reverzibilis affinitása a célfehérjére viszonylag kicsi ( $K_i$ : ARS-853 esetén 200  $\mu\text{M}$ , ARS-1620 esetén 64  $\mu\text{M}$ ), irreverzibilis reaktivitása viszont nagy, ezért ezen inhibitorok hatékonysága főleg az elektrofil csoport reaktivitásának köszönhető, a reverzibilis kötésnek leginkább az inhibitor Cys12 közeli lokális koncentrációjának növelésében, illetve az elektrofil csoport pozicionálásában és elrendezésében van szerepe [10]. Ezek az eredmények rámutattak, hogy bár tradicionálisan az inhibitortervezési folyamatok a reverzibilis interakciók optimalizálására fókuszálnak, kovalens inhibitorok fejlesztése esetén legalább ugyanakkora jelentőséget kell tulajdonítani a reaktív csoport optimalizálásának.

Az ARS-917 inhibitorból kiindulva Zeng és társai azt vizsgálták, hogy a kinazolinváz C2-szénatomján különböző aminszubsztituens csoportoknak milyen hatása van az inhibitor aktivitására. Western-blot analízissel vizsgálták a KRAS G12C molekulatömegében bekövetkezett változást, valamint a MEK-útvonalon történő jeltovábbítást, és azt tapasztalták, hogy amino-amid-szubsztituált inhibitorok esetében volt a leggyengébb a jeltovábbítás, ezért azt feltételezik, hogy ez a módosítás elősegíti az inhibitor KRAS G12C-hez való illeszkedését, valamint szelektivitását [11]. A kinazolinvázon található egyéb szubsztituensek optimalizálásával (a 2-fluorofenil-csoportot egy naftalinszármazékra cserélve) jutottak el a 3-AM és 4-AM vegyületekhez, amelyek 5  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett 5 nap alatt megszüntették a tüdőráksejtvonalak növekedését, valamint hődenaturációs vizsgálatok alapján erősen kötődnek a KRAS G12C-hez. További érdekes eredményük volt, hogy olyan molekulákban, amelyek nem tartalmazták a reaktív akrilamidcsoportot, sikerült antiproliferatív hatást kimutatni KRAS-mutációt nem tartalmazó sejtvonalak esetében, ami arra utal, hogy ezek a molekulák reverzibilis

1. TÁBLÁZAT. Publikált kovalens KRAS G12C inhibitorok fontosabb jellemzői

	Ref.	Biokémiai hatékonyság $k_{obs}/[I]$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	Denaturációs hőmérséklet eltolódása $\Delta T_m$ ( $^{\circ}C$ )	IC <sub>50</sub> sejtes rendszerben	Egér plazma-stabilitás	Egér orális hasznosulás	PDB-kód
12-es molekula	5	0,1-0,33	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
8-as molekula	5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	4LYF
ARS-853	6	3-150/250	21*	2,5 $\mu M^{\dagger}$	<0.3	<2%	5F2E
ARS-107	10	8,5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	6B0V
ARS-917	10	14-30/29	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	6B0Y
ARS-1620	9	1100	18*	150 nM <sup>†</sup>	2,5 hr	63%	5V9U
3_AM	11	n. a.	18,5	n. a.	n. a.	n. a.	5V9L
4_AM	11	n. a.	20	1,2 $\mu M^{\dagger}$	n. a.	n. a.	n. a.
BI-2852	12	n. a.	n. a.	6,7 $\mu M$	n. a.	n. a.	6GJ8
AMG-510	13	9900	n. a.	6 nM <sup>†</sup>	n. a.	n. a.	6OIM

\*saját eredmény, <sup>†</sup>H358 72 h, <sup>‡</sup>H358 5 nap, n. a.: nincs adat

inhibitoroként is alkalmazhatóak lehetnek. A fent bemutatott kovalens KRAS G12C inhibitorok fontosabb jellemzőit az 1. táblázatban összegeztük.

## A KONZORCIUM FEJLESZTÉSEI ÉS EREDMÉNYEI – STRATÉGIA KIDOLGOZÁSA GYÓGYSZERJELÖLT MOLEKULÁK AZONOSÍTÁSÁRA (2. ábra)

### Kémiai kiindulópont azonosítása

A gyógyszerkutatás során a kiválasztott célfehérje kívánt irányú funkcionális modulációját tűzzük ki célul, melyhez a kismolekulás gyógyszerkutatásban kémiai kiindulópontok azonosítása szükséges. Ezen azonosított kémiai kiindulópontok széles körű (biológiai, kémiai, valamint fizikai-kémiai) jellemzésen, illetve elsődleges optimáláson esnek keresztül. Ennek eredményeként vezérmolekulát kapunk, mely a gyógyszerkutatási programok egyik első mérföldköve (14).

A kémiai kiindulópont keresése alapvetően kétféle megközelítésre bontható, szűrésalapú, illetve tudásalapú módszerekre (15). Előbbi esetben egy megfelelően megválasztott teszttel (biokémiai vagy biofizikai) vagy elméleti modellel nagyszámú molekulát vizsgálunk, melynek eredményeként a kiválasztott célponttal kölcsönhatásba lépő vegyületeket tudjuk azonosítani. A tudásalapú módszerek esetében a célfehérjével, illetve az azon aktív vegyületekkel kapcsolatos, már rendelkezésre álló ismeretek alapján történik az új kémiai kiindulópont azonosítása általában meglévő vegyületek alapján (például alapváz-helyettesítéssel) (16, 17).

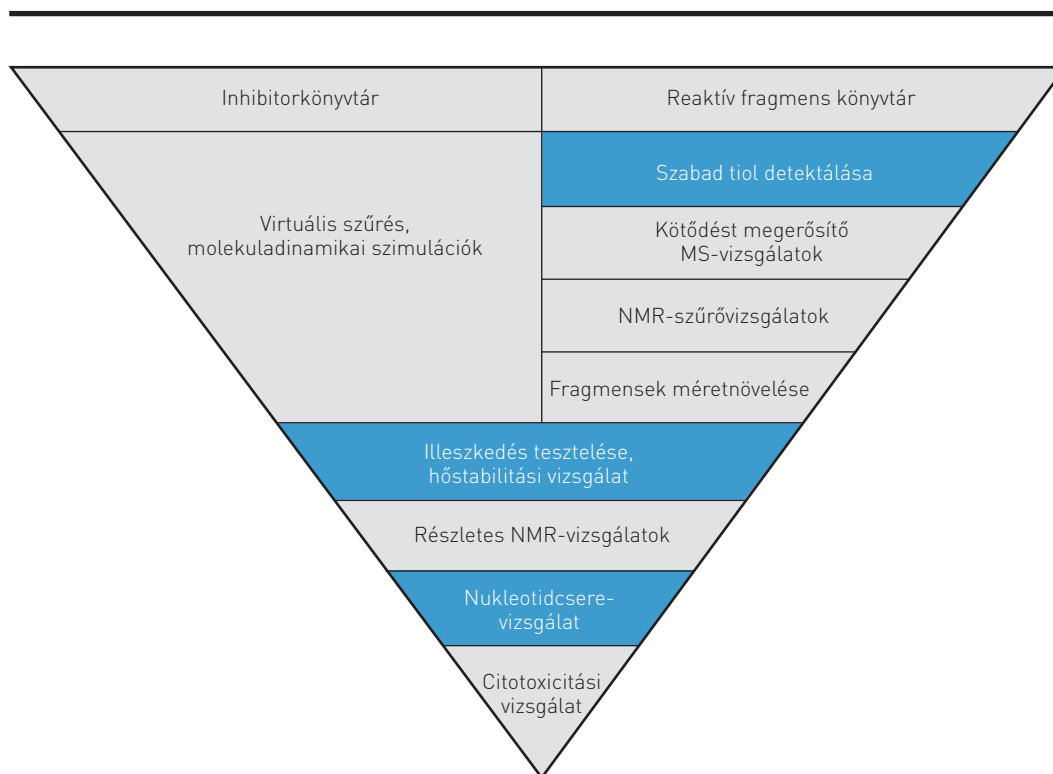
Munkánk során a kémiai kiindulópont azonosítására két szűrésalapú módszert alkalmaztunk, az első esetben a csoportban elérhető kovalens fragmens vegyülettáron végeztünk szűrést Ellman-teszt segítségével 584 vegyületen. A mérés alapelve, hogy az Ellman-reagens [5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoesav)] a fehérje szabad ciszteinjével reagál, és a reakció

során keletkező kromofor 5-merkaptó-2-nitrobenzoesav a látható hullámhossztartományban érzékelhető abszorbanáciát mutat. Az abszorbancia megváltozásának mértékéből következtetni lehet a szabad tiolok mennyiségére és így a vizsgált fragmensek fehérjejelölésére.

A mérésekhez a fragmenseket és a fehérjét összemértük úgy, hogy a keletkező oldat 25 mM  $NaH_2PO_4$ -t, 0,1 mM EDTA-t, 150 mM NaCl-t, 2  $\mu M$  fehérjét, 5% DMSO-t és 200  $\mu M$  fragmenst tartalmazzon. Az így keletkező elegyet 1-2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 16  $\mu l$ -t vettünk ki belőle és 4  $\mu l$  tiolreagenst (Invitrogen assay kit) adtunk hozzá. Az egyes méréseket duplikálva végeztük, melynek eredményeként 180 vegyületet azonosítottunk további vizsgálatokra (CFL vegyületek).

A második esetben pedig számítógépes szűrést, egy úgynevezett dinamikus „undocking” alapú szűrési protokollt alkalmaztunk, melyben 55 000 akrilamid warheaddel (kovalens kötés kialakítására alkalmas csoport) rendelkező vegyületet használtunk fel (18).

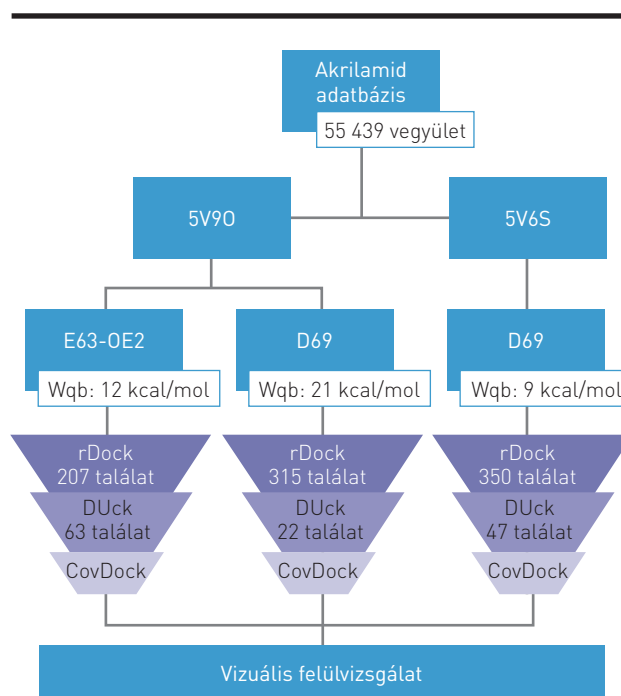
A protokollhoz a PDB adatbázisból kiválasztottuk a röntgenszerkezettel rendelkező kovalens ligandumokat, amelyek a KRAS Cys 12-höz kötődnek akrilamid warheaddel. Az így kapott 12 fehérjeszerkezet esetén első lépésként dinamikus „undocking” (DUck)-ot használtunk a röntgenligandumok komplexben vett hidrogénkötései erősségének értékeléséhez. Ennek során egy sorozat irányított molekuladinamikai simulációt (SMD) használtunk, hogy a ligandum kísérleti, nem kötött formáját 5 Å távolságra mozgassuk a fehérje definiált kötőhelyétől. Azt az erőt, ami a ligandum elhúzásához volt szükséges, arra használtuk, hogy kiszámoljuk a „munkaértékét” (Wqb), amely jellemzi az értékelt H-kötés erősségét. Az így azonosított erős H-kötéseket (Wqb > 6 kcal/mol) használtuk fel a számításokhoz, mint farmakofór-megkötés.



2. ÁBRA. A RASopátia konzorciumon belül megvalósuló gyógyszerfejlesztési folyamat egyes lépései

A szűrési protokollt a 3. ábra szemlélteti. Az akrilamid-adatbázist rDock segítségével nem kovalens protokoll felhasználásával dokkoltuk a kiválasztott szerkezetekbe a fenti farmakofór-megkötést alkalmazva. Amennyiben több erős H-kötés is volt a fehérje-ligandum komplexben, akkor a protokollt mindegyikre külön futtattuk. Annak érdekében, hogy elkerüljük a warhead referenciaszerkezetben talált pozíciójától való nagy eltérést, a számítások során RMSD-küszöbértéket is beállítottunk.

Következő lépésként DUck-ot alkalmaztunk, hogy a korábban dokkolt ligandumok H-kötéseinek erősségét értékeljük. Ha a talált vegyület Wqb-értéke a küszöbérték felett volt, akkor továbbvittük az utolsó lépéshez, a kovalens dokkoláshoz. A CovDock esetenként az rDocktól nagymértékben eltérő kötőmódokat mutatott a warhead kovalens kötéshez szükséges optimális geometriájának kialakítása miatt, valamint a kovalens kötés kialakulása miatt megváltozott a találatvegyületek rangsora is. A kovalens dokkolást követően végül a különböző dokkolási módszerek által generált kötőkonformációk közötti konszenzus alapján 10 akrilamid-alapú virtuális találatot azonosítottunk, melyek az MRAS6-15 elnevezést kapták. E vegyületek a DUck szerint erős H-hidas kölcsönhatásokat alakítanak ki a fehérjével, amely lehetőséget biztosíthat, hogy a ligandum kellő ideig tartózkodjon a kötőhelyen a kovalens kötés kialakulásához.



3. ÁBRA. A DUck alapú virtuális szűrési protokoll

### Izotópjelölt fehérjék expressziója és tisztítása

A His-címkével és TEV proteáz hasítóhellyel N-terminálison megtöltött KRAS 4B-G12C mutáns kódoló gént pET-15b expressziós plazmidok tartalmazták. A plazmidokat *E. coli* BL21(DE3) gazdasejtbe transzformáltuk, majd a transzformált sejteket 2YT tápoldatban növesztettük 37 °C-on, 180 rpm rázatással, 0,1 g/dm<sup>3</sup> ampicillin mellett. Amikor az OD<sub>600</sub> elérte 0,7–0,8 értéket, a sejteket centrifugáltuk, minimáltáploldatban mostuk és reszuszpendáltuk (<sup>15</sup>N-jelölés esetén 1 g/dm<sup>3</sup> <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl és 4 g/dm<sup>3</sup> D-glükóz). 1 órán át ráztattuk, majd 0,5 mM IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk. 3 óra 37 °C-os rázatás után centrifugáltuk a sejteket, majd reszuszpendáltuk a lízispufferben (500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 20 mM Tris, pH=8,0), és –20 °C-on tároltuk. Felolvasztás után a sejteket szonikálással tártuk fel. A fehérjét tartalmazó felülúszót centrifugálással különítettük el. A célfehérjét három kromatográfiás lépésben választottuk el a szennyezőktől. Először nikkel-nitriocetsav (5 ml, Ni-NTA) fémion-affinitáskromatográfiával tisztítottuk. A lízispufferrel egyensúlyba hozott oszlopra felvittük, majd mosás után 250 mM imidazol tartalmazó lízispufferrel eluáltuk a célfehérjét. Az így megtisztított mintát dializáltuk dialízispufferben (500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 20 mM Tris, pH=8,0), mialatt His-címkével ellátott TEV proteázzal emésztettük. A tisztítás és az emésztés eredményét nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük. A TEV-emésztett fehérjét újra Ni-NTA oszlopra vittük, hogy a TEV proteáztól és a His-címkétől elkülöníthessük. Végül méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk Superdex 75 Increase (10/300 GL) oszlopon 10 mM EDTA-t tartalmazó PBS-t (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) alkalmazva eluensként. Az így elkészült nagy tisztaságú fehérjeoldatot 0,5–1,0 mM koncentrációra töményítettük, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és –80 °C-on tároltuk.

### NMR-spektroszkópiai mérések

Az MRAS6-12, valamint az MRAS14 és MRAS15 jelű kismolekulák egy újonnan publikált, kovalens dokkolásra alapuló virtuális szűrési módszer alapján kiválasztott, a KRAS G12C-GDP fehérjéhez kötődő gyógyszerjelöltek (18). A kötődés kísérleti tesztelését NMR-mérésekkel végeztük egy Bruker Avance III 700 MHz készüléken, 5-mm Prodigy TCI H&F-C/N-D, z-gradiens mérőfejjel felszerelve, amely vivőfrekvenciája 700,05 MHz az <sup>1</sup>H and 70,94 MHz <sup>15</sup>N atommagok esetében. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC spektrumokat mértünk 298 K hőmérsékleten, hogy a fehérje <sup>1</sup>H és <sup>15</sup>N kémiai eltolódásait és jelintenzitásait meghatározhatassuk szabad és kötött állapotban. A szabad állapotú fehérje kémiai eltolódásait korábbi munkánk alapján határoztuk meg (19), ez esetben az 5% DMSO hozzáadása okozott kevés eltérést, amelyek jól követhetők voltak a spektrumokon. Az NMR-minták összetétele a következő volt: a szabad fehérje mérése esetében 150 μM, míg a kismolekulás kötődési vizsgálatokban 50 μM GDP-kötött, <sup>15</sup>N-jelölt KRAS 4B-G12C

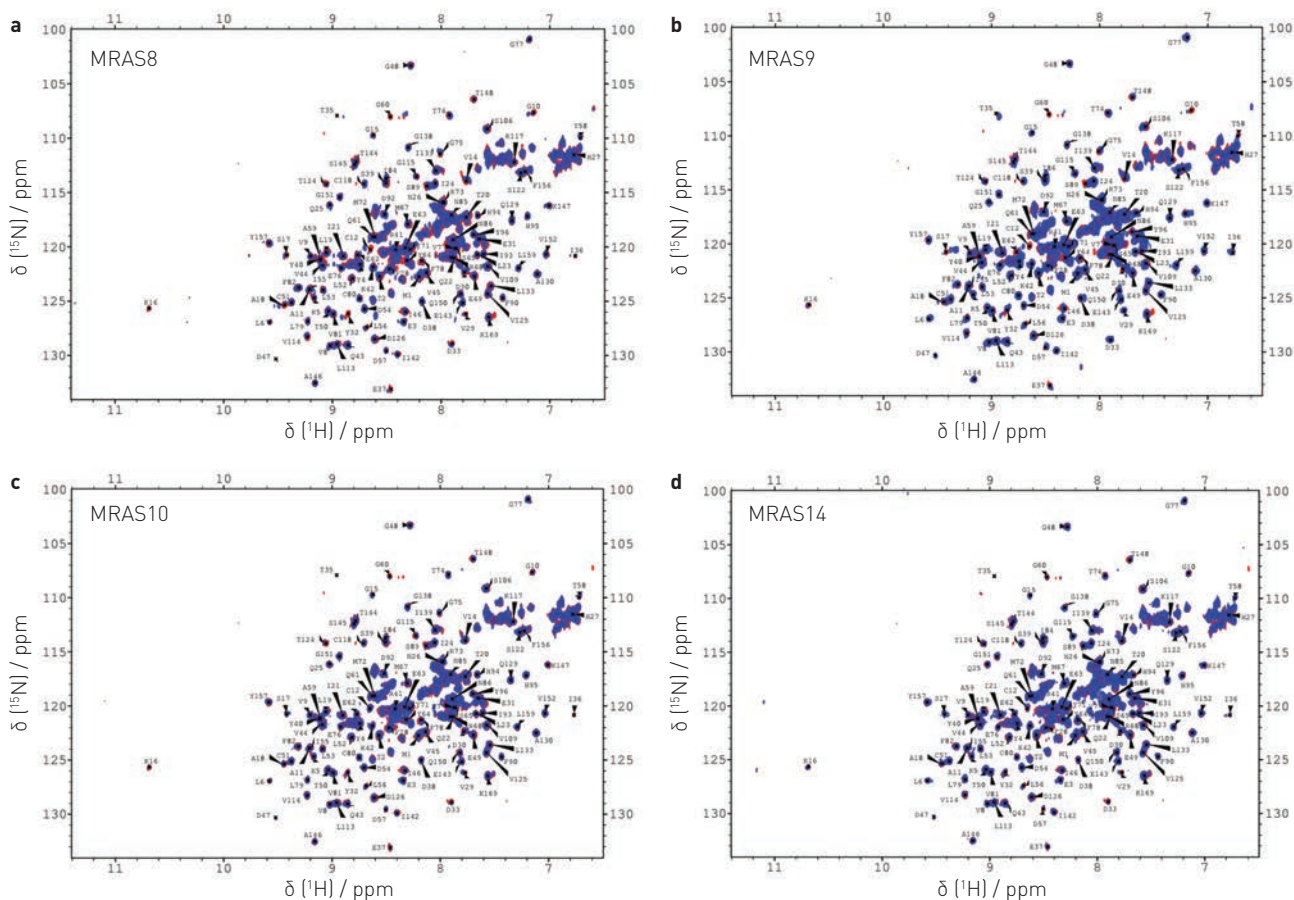
(katalitikus doménje: az 1–169. aminosavak), emellett mindig egy mérés esetében 5 mM GDP, 10 mM EDTA, 15 mM MgCl<sub>2</sub> PBS-ben, 5% DMSO és 10% D<sub>2</sub>O hozzáadásával, pH 7,4-re lett beállítva. A kötődési tesztekben a fehérjeoldathoz a számított koncentrációban DMSO-oldatban adtuk hozzá a kismolekulákat. A kismolekulák elméleti végső koncentrációja 150–500 μM volt, de mivel rosszul oldódtak, az aktuális oldatbeli pontos koncentrációjuk bizonytalan. A rossz oldhatóság miatt hosszú inkubációs időt alkalmaztunk (96 óra), mivel az irreverzibilis kovalens kötődés következtében a hosszabb inkubációs idő alatt a rosszul oldódó kismolekulák esetében is az egyensúlyi viszonyok miatt viszonylag nagyarányú kötődés volt detektálható. A kis fehérjekoncentráció miatt pedig nagy, NS=128 ismétlődési számmal mértük a spektrumokat. Az <sup>1</sup>H kémiai eltolódások esetében a DMSO jele volt a referencijel, amely a szabad fehérje oldatában DSS alapján volt kalibrálva, mivel DSS-t nem adtunk a kötődési tesztekhez (elkerülve a mellékreakciókat). Az <sup>15</sup>N kémiai eltolódásokat indirekt módon kalibráltuk a IUPAC által javasolt konvencióban megadott giromágneses együttthatók adatait használva. A spektrumok processzálása Bruker TopSpin 3.5 szoftverével történt, és az analízis az NMRFAM-SPARKY szoftverrel készült (20).

### Az MRAS kismolekulák kötődésének tesztelése NMR-spektroszkópiával

A kismolekulák kötődését a <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC spektrumon bekövetkező kémiai eltolódásváltozásokon keresztül tudtuk tesztelni. A megfelelő inkubációs idő után egyértelmű kötődést tapasztaltunk négy esetben: MRAS6, MRAS8, MRAS9, MRAS11, nem volt kötődés két esetben: MRAS14 és MRAS15. Három esetben (MRAS7, MRAS10 és MRAS12) pedig nem egyértelmű az eredmény, mert ugyan megváltoztak a HSQC-spektrumon az eltolódások, ám a szabad fehérje jelei is megmaradtak. Emellett ezek esetében a rossz oldhatóság is akadályozza a kötődés egyértelmű kimutatását. Ezért ezek az eredmények inkább részleges kötődésre utalnak (4. ábra). Az NMR-mérések alapján azt is megállapítottuk, hogy a kötődő kismolekulák a várható módon a Cys12 ciszteinnel, és nem a többi ciszteinnel (Cys51, Cys80, Cys118) alakítanak ki kovalens kötést, sőt a korábban felfedezett kovalens inhibitorok, az ARS-853 (6) és az ARS-1620 (9) kötőzsebébe kötődnek.

### In vitro, in vivo modellrendszerek kidolgozása

Vizsgálatainkat KRAS-vad, illetve G12C, G12D vagy G12V KRAS-mutáns vastagbél-, hasnyálmirigy- és tüdőráksejtvonalakon végeztük (kiegészítő 2. táblázat). A KRAS-mutációra nézve mind hetero-, mind homozigóta sejtvonalakkal dolgoztunk. Továbbá olyan izogenikus sejtvonalakon is végeztünk vizsgálatokat, ahol az eredetileg csak vad KRAS-t hordozó sejteket transzformálták KRAS-mutációt hordozó vektorokkal. A sejtek 3D tenyésztéséhez polyHEMA-kezelt 96 lyukú, U-aljú sejttenyésztő edényeket használtunk. Ko-kultúra létrehozására a H358 humán tüdő-adenokarcinóma sejtvonalat, HUVEC-TERT immortalizált humán köldökzsínór-endotél sej-



**4. ÁBRA.** MRAS-vegyületek NMR-spektroszkópiával mért kötődése a KRAS fehérjéhez (a) az MRAS8, (b) az MRAS9, (c) az MRAS10 és (d) az MRAS14 kismolekula esetében. A spektrumokon minden jel egy aminosavgerinc NH keresztcsúcsát jelöli, a piros szín a szabad állapotúhoz, a kék a kismolekula hozzáadása utáni állapotúhoz tartozik. Az a és b ábra spektrumai az egyértelmű kötődést mutatják, hiszen több GDP-hez térben közeli aminosav jele kiszélesedik vagy elmozdul (például Lys16, Tyr32, Thr35, Glu37, Gly60, és Cys12, amihez kötődik a kismolekula) a kismolekula hozzáadása után. A c ábra spektrumán látható változás, de kevesebb aminosav esetében, illetve a Cys12 esetében kötött és szabad állapot egyaránt detektálható, ezért részleges kötődést állapíthatunk meg. A d ábra spektrumán nem látható változás

teket, illetve normális humán bőr fibroblasztokat (CCD986SK) használtunk fel. Az MRAS molekulák méréseit a 8. napon, a ko-kultúrák kísérleteknél a 6. napon a sferoidokról készült képek alapján az ImageJ program segítségével értékeltük ki. A ko-kultúrák sferoidok esetében az egyes sejttípusokat immunhisztokémiai markerekkel (CD31 – endotélsejt, CK7 – adenokarcinóma) jelöltük meg. A fibroblasztok mind a két markerre nézve negatívak voltak.

#### G12C-specifikus MRAS-inhibitorok *in vitro* tesztelése

Az MRAS molekulákat vizsgáltuk 3D esszéknél KRAS-ra nézve vad típusú (LCLC103H) és KRAS G12C mutációra nézve heterozigóta (H358) valamint homozigóta (H1792) sejtvonalakon is. A sferoidokat 8 napon át kezeltük az inhibitorokkal, majd a végtérfigatukat meghatároztuk. Eredményeink szerint az ARS-853 és ARS-1620 inhibitorok az irodalomban már

leírt hatékonyságot mutatták, vagyis esetükben szelektív növekedésgátló hatást tapasztaltunk a KRAS G12C mutáns sejtvonalakon (2. táblázat). Az általunk vizsgált MRAS molekulák közül bár volt olyan, amely növekedésgátlást okozott (MRAS7, -10, -11), de ez nem bizonyult szelektívnek a KRAS G12C mutáns sejtvonalakra.

A tumor-endotél-fibroblaszt sejtekből álló kompozit sferoid modellt ARS-1620 KRAS G12C mutációspecifikus inhibitor kezeléssel validáltuk (5. ábra). Létrehoztunk csak normális sejteket (endotél+fibroblaszt) tartalmazó sferoidokat is, a mutációspecifikus inhibitor esetleges „mellékhatásainak” tesztelésére. A kezelés során azt tapasztaltuk, hogy a csak normális sejteket tartalmazó sferoidoknál a kezelés csekély, de szignifikáns szinten megnövelte a sferoidok térfogatát. Ezzel szemben a KRAS G12C mutáns H358 tüdőadenokarcinóma-sejtvonalat is tartalmazó sferoidoknál a kezelés

**2. TÁBLÁZAT.** KRAS G12C specifikus inhibitorok IC<sub>50</sub>-értékei

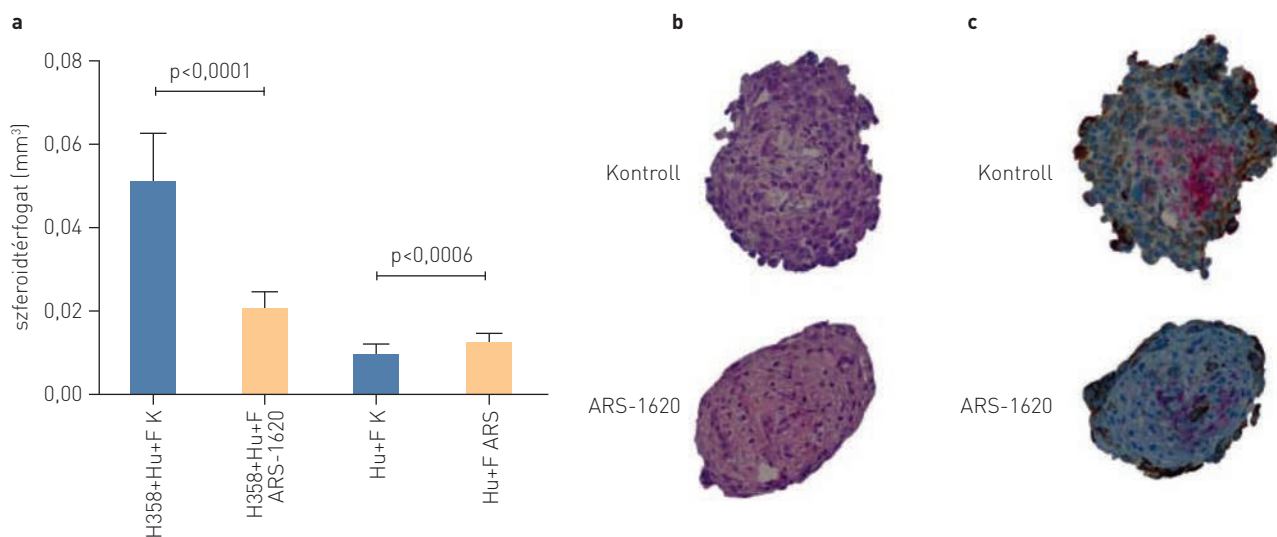
	LCLC103H (vad)	H358 (G12C) heterozigóta	H1792 (G12C) homozigóta
3D esszé			
ARS-853	>100 µM	2,4 µM	3,1 µM
ARS-1620	>100 µM	0,4 µM	2 µM
MRAS6*	>100 µM	>100 µM	>100 µM
MRAS7	23,2 µM	29,5 µM	>100 µM
MRAS8*	52,9 µM	>100 µM	>100 µM
MRAS9*	61,3 µM	>100 µM	16,2 µM
MRAS10	22,6 µM	26,4 µM	19,3 µM
MRAS11*	10 µM	26,4 µM	19,3 µM
MRAS12	>100 µM	>100 µM	>100 µM
2D esszé			
CFL229	2,03 µM	1,2 µM	1,9 µM
CFL137	30,7 µM	12,7 µM	13,2 µM
CFL213	78,7 µM	97,9 µM	28,1 µM
CFL471	19,1 µM	25,4 µM	11,2 µM
CFL120	27,8 µM	17,7 µM	11,2 µM
ARS-853	40,2 µM	7,2 µM	27,6 µM

8 napos 3D esszé. \*NMR alapján a KRAS G12C mutáns fehérjéhez kötődő molekulák

drasztikus mértékben csökkentette a kezelt szferoidok térfogatát. A szövettani metszeteken látható, hogy az aberráns, nagyméretű sejtmagok aránya jelentősen csökken a kezelt szferoidokban a hematoxin-eozin festett metszetek alapján (5.b ábra). Az immunhisztokémiai festés eredményei alapján azt látjuk, hogy a CK7-pozitív tumorsejtek aránya drasztikus csökkenést mutat az ARS-1620-kezelt szferoidokon a kontrollszferoidokhoz viszonyítva, míg a CD31-pozitív endotélsejtek, illetve a duplanegatív fibroblasztok aránya jelentősen nő.

### Kismolekulájú gyógyszerjelöltek tesztelése

A kísérletek során a korábban a kémiai szűrésekben hatásosnak bizonyult CFL vegyületeket nagy áteresztőképességű rendszerben vizsgáltuk vad típusú KRAS-t (LCLC-103H) és G12C mutáns KRAS-t (H1792) expresszáló tüdőráksejteken. Az előkísérletek során beállítottuk a megfelelő kiindulási sejtszámot, és meghatároztuk a tumorsejtek DMSO-toleranciáját. Ezután 384-es lemezekben összesen 180 vegyület citotoxicitását vizsgáltuk két kiválasztott koncentrációban (25 µM és 2,5 µM), 3-3 párhuzamossal, 72 óra inkubációs idővel először a mutáns KRAS-t expresszáló tumorvonalon. A sejtek viabilitását a kísérlet végén 10%-os PrestoBlue reagenssel határoztuk meg (1 óra inkubáció), az élő sejtek által átalakított reagens fluoreszcenciáját EnSpire lemezolvasóval detektáltuk. Az értékeket a pozitív (elpusztított, 0) és negatív (kezeletlen, 1) sejtek értékeihez normalizáltuk (kiegészítő 2.a ábra). A kísérlet során 34 olyan vegyületet sikerült azonosítani, ami



**5. ÁBRA.** Tumor-endothelial-fibroblast szferoidok. a) H358 tüdő-adenokarcinóma (KRAS G12C mutáns), HUVEC-TERT endotél (Hu), illetve CCD986SK fibroblaszt (F) sejtekből létrehozott szferoidok térfogatai a kezelés 6. napján. A tumorsejteket is tartalmazó szferoidoknál a kontrollhoz képest jelentős térfogatcsökkenést ért el az ARS-1620-kezelés, míg a csak normális sejteket tartalmazó szferoidok térfogata megnőtt a kezelés hatására. b) Hematoxin-eozin festett szferoidmetszetek reprezentatív képei. c) CK7- (barna, H358), CD31- (rózsaszín, HUVEC-TERT) jelölt immunhisztokémiai metszetek reprezentatív képei. Jól látható a CK7-pozitív sejtek csökkent aránya az ARS-1620-kezelés hatására



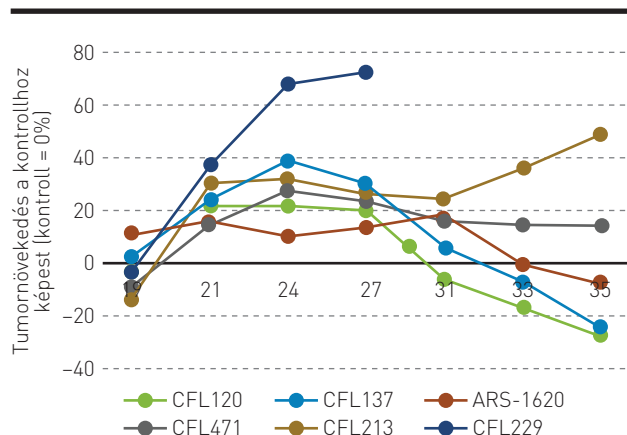
25  $\mu\text{M}$ -ban képes volt 50% alá csökkenteni a viabilitást, ezek közül 4 fragmens már 2,5  $\mu\text{M}$ -ban is hatásos volt. Ezért a továbbiakban a 34 vegyületet és az ARS-853-at, mint irodalmi kontrollt megvizsgáltuk a vad típusú KRAS-t expresszáló LCLC-103H sejtek viabilitására is (kiegészítő 2.b ábra). Az eredmények alapján kategorizálva a vegyületeket a két sejtvonalon mutatott hatásosságuk alapján kiválasztottuk azokat, amelyek a legnagyobb mértékben mutattak H1792-szelektivitást az LCLC-103H sejtekhez képest *in vitro* 2D esszében. Ez alapján öt CFL vegyületet vittünk tovább a fejlesztésben (2. táblázat), állatmodellben kipróbálva a hatásukat a kétféle daganatsejt növekedésére.

#### Kísérleti állatok, szubkután tumormodellek, kezelések

A vizsgálatokba immunhiányos NOD/SCID egereket vontunk be a saját SPF tenyészetünkből. A felhasznált állatokat a Helsinki nyilatkozaton alapuló „Állatok gondozásának és felhasználásának alapelvei” szerint tartottuk, és azokat a helyi etikai bizottság jóváhagyta (engedélyek: PEI/001/1715-2/2015 és PEI/001/3584-10/2014).

A tumorsejteket ( $3 \times 10^6$ /állat, 200  $\mu\text{l}$  folyadékban) szubkután injektáltuk a kísérleti állatok hátbőre alá. A kezeléseket 19 nappal a tumortranszplantáció után kezdtük meg, amikor a tumorok átlagos térfogata 173  $\text{mm}^3$  volt. A vegyületeket 8% DMSO/víz oldatban oldottuk, és ip. injekcióval juttattuk az állatokba (6-8 állat/csoport). A kontrollcsoportba tartozó egereket oldószerral kezeltük, míg a kezelési csoportokban lévő egereket az első és a második héten hetente 5 alkalommal, állatonként 5 mg/kg és 15 mg/kg dózisban, 0,2 ml térfogatban kezeltük, míg a kezelés harmadik hetében az egereket 3 alkalommal kezeltük, állatonként 30 mg/kg mennyiségben, 0,4 ml térfogatban. Az állatok tömegét és a daganatok térfogatát a kezelés megkezdésekor és meghatározott időközönként meghatároztuk. A kísérlet befejezését 33 nappal a sejtoltás után, vagyis a kezelés megkezdése után 15 nappal végeztük, mivel a daganatok átlagos térfogata egyes csoportokban elérte az 1800  $\text{mm}^3$ -t, míg a kontroll és egy másik csoport esetében a sejtbeoltás után 35 nappal, vagyis 17 nappal a kezelés megkezdése után fejeztük be a kísérletet.

Az eredmények azt mutatták, hogy a kezeletlen kontrollhoz képest az irodalmi pozitív kontroll ARS-1620-as szerrel összehasonlítva két vegyületünk (CFL120, CFL137) is csökkentette a tumorok növekedését, míg a három másik vizsgált vegyület nem bizonyult hatásosnak (6. ábra). Ugyanakkor ez a gátlás szelektívnek bizonyult a G12C KRAS-mutációt



6. ÁBRA. CFL inhibitorjelölt vegyületek hatása a H1792 G12C-KRAS-mutáns emberi tüdőrák *in vivo* növekedésére [ARS: kontrollinhibitor]

expresszáló sejtvonalra, mert a vad típusú KRAS-t kifejező LCLC-103H sejteken a kísérlet végén 10% alatti, nem szignifikáns növekedéscsökkenést mértünk. Kiemelendő, hogy az általunk alkalmazott kezelési dózisok 30–60-szor alacsonyabbak, mint a jelenleg klinikai fázisban tesztelt hatóanyag alkalmazási dózisa.

#### KONKLÚZIÓ

A RASopátia Konzorcium 2016-os megalakulásakor a mutáns RAS inhibitor létrehozása jobbra állomnak tűnt. Mint utóbb kiderült, elsősorban az Egyesült Államokban számos nagy kutatócsoport is ugyanilyen ambíciókkal kezdett dolgozni a feladaton, mint a hazai csoport. Szemben azonban a külföldi kutatókkal, a hazai csapat igen nagy figyelmet szentelt a RAS-t övező biokémiai dogmák kérdésének, a kritikus 3D-s struktúrájának, és nem utolsósorban a megfelelő *in vitro* és *in vivo* modellrendszerek kidolgozásának, amelyek alkalmasak arra, hogy a majdani klinikai körülményeket minél jobban szimulálják. A 3 éves erőfeszítések eredményeként számos gyógyszerjelöltnek tekinthető kémiai struktúra került azonosításra, amelyek a korábban használt, leghatékonyabbnak számító alapstruktúrákkal összevethető biológiai aktivitást mutattak. Jelenleg a legfontosabb feladat az lenne, hogy a konzorcium, kihasználva kutatásai beérő eredményeit, minél hamarabb szabadalmi bejelentést tegyen és folytassa sikeresen megkezdett fejlesztéseit.

## IRODALOM

1. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with bone KRAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep* 7:39721, 2017
2. Kafatos G, Niepel D, Lowe K, et al. RAS mutation prevalence among patients with metastatic colorectal cancer. *Biomark Med* 11:751–760, 2017
3. Ghimessy AK, Geilert A, Schlegl E, et al. KRAS mutations predict response and outcome in advanced lung adenocarcinoma patients receiving first-line bevacizumab and platinum based chemotherapy. *Cancers* 11:E1514, 2019
4. McCormick F. Progress in targeting RAS with small molecule drugs. *Biochem J* 476:365–374, 2019
5. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503:548–551, 2013
6. Patricelli MP, Janes MR, Li LS, et al. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state. *Cancer Discov* 6:316–329, 2016
7. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, et al. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Mol Cancer Res* 13:1325–1335, 2015
8. Lito P, Solomon M, Li LS, et al. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* 351:604–608, 2016
9. Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. *Cell* 172:578–589, 2018
10. Hansen R, Peters U, Babbar A, et al. The reactivity-driven biochemical mechanism of covalent KRASG12C inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* 25:454–462, 2018
11. Zeng M, Lu J, Li L, et al. Potent and selective covalent quinazoline inhibitors of KRAS G12C. *Cell Chem Biol* 24:1005–1016.e3, 2017
12. Kessler D, Gmachl M, Mantoulidis A, et al. Drugging an undruggable pocket on KRAS. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:15823–15829, 2019
13. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 575:217–223, 2019
14. Keserű GyM. A gyógyszerkutatás kémiája. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2015
15. Keserű GM, Makara GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today* 11:741–748, 2006
16. Markush EA. U.S. Patent No. 1,506,316, granted: 26th August, 1924
17. Reich HJ, Cram DJ. Macro rings. XXXVII. Multiple electrophilic substitution reactions of [2.2]paracyclophanes and interconversions of polysubstituted derivatives. *J Am Chem Soc* 91:3517–3526, 1969
18. Rachman M, Scarpino A, Bajusz D, et al. DUckCov: a dynamic undocking-based virtual screening protocol for covalent binders. *Chem Med Chem* 14:1011–1021, 2019
19. Pálffy G, Vida I, Perczel A. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N backbone assignment and comparative analysis of the wild type and G12C, G12D, G12V mutants of K-Ras bound to GDP at physiological pH. *J Biomol NMR Assign*, 2019, doi: 10.1007/s12104-019-09909-7
20. Lee W, Tonelli M, Markley JL. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* 31:1325–1327, 2015