

## Sachbericht zum Verwendungsnachweis

**Vorhabenbezeichnung:** PROXIDRUGS: Innovative molecular glues (iGLUE)

**Förderkennzeichen:** 03ZU1109EA, 03ZU1109EB

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.10.2021 – 31.12.2024

**Zuwendungsempfänger:** Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Technische Universität Darmstadt

**Verantwortliche:** Ivan Dikic (GUF), Felix Hausch (TUDa)

**Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.**

### Teil I: Kurzbericht (wird veröffentlicht)

---

#### **Ursprüngliche Aufgabenstellung/wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn:**

Das iGLUE-Projekt, Teil des Zukunftsclusters PROXIDRUGS, verfolgte das Ziel, molekulare Klebstoffe (MoGs) systematisch als neue Klasse therapeutischer Wirkstoffe zu entwickeln. Diese niedermolekularen Verbindungen fördern gezielte Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere bei schwer zugänglichen Wirkstoffzielen. Der Schwerpunkt des Projekts lag auf innovativen Screening-Strategien, mechanistischen Untersuchungen und der Optimierung von MoG-Kandidaten. Das Vorhaben gliederte sich in vier Arbeitspakete: Identifizierung von Indirubin-abgeleiteten MoGs (**AP1**), Entwicklung neuer Screening-Methoden zur MoG-Entdeckung (**AP2**), Erstellung und Validierung von FaMoGs (**AP3**) sowie strukturelle Charakterisierung von FaMoG-Komplexen mittels Massenspektrometrie (**AP4**).

#### **Ablauf des Vorhabens und wesentliche Ergebnisse:**

In **AP1** führte ein high-throughput screening von 100 Indirubin-Analoga zu mehreren aktiven Verbindungen. Die verantwortliche E3-Ligase wurde als VHL identifiziert, und ein struktur-basiertes Bindungsmodell für den Leit-wirkstoff wurde aufgeklärt. Darüber hinaus wurde mit „ProGrader 1“ der erste auf das Proteasom abzielende Degradier entwickelt und damit ein Machbarkeitsnachweis für eine neue TPD-Strategie erbracht.

In **AP2** wurde ein chemisches Screening von über 5.000 Verbindungen durchgeführt, bei dem 12 vielversprechende MoG-ähnliche Verbindungen (DL01–DL12) identifiziert wurden. Unter ihnen erwiesen sich DL05 und DL06 als potente Degradier eines zentralen mitotischen Regulators und krebisrelevanten Proteins. Proteomik-Analysen, Immunblotting und

CRISPR-Cas9-Resistenz-Screenings bestätigten, dass diese Verbindungen den Zielproteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System induzieren und funktionelle Cullin-RING-Ligasen erfordern. Zukünftige Arbeiten werden sich auf die Aufklärung des Wirkmechanismus und der strukturellen Merkmale dieser MGs konzentrieren.

In **AP3** lieferte ein breit angelegtes HTRF-Screening von über 60 Zielproteinen mehrere FaMoG-Treffer. Neu etablierte Assays (FP, nanoBRET, Photokreuz-vernetzung) sowie SAR-Optimierungen steigerten die Wirksamkeit ausgewählter Leitstrukturen in den niedrigen bis submikromolaren Bereich. Die native Massenspektrometrie validierte zuverlässig ternäre FKBP12-FaMoG-Komplexe und erwies sich als robustes Sekundär-, ja sogar Primär-Screening-*Toolbox*.

In **AP4** bestätigte die native MS ternäre Komplexe für drei FKBP12-basierte Glues. Ion-Mobilitätsdaten und CID-Titrations lieferten die ersten Gasphasen-Stabilitätsprofile, die mit den Potenzen in Lösung korrelieren. Kollisionsinduzierte Entfaltungsexperimente offenbarten unterschiedliche Dissoziationswege für natürliche gegenüber synthetischen Glues und lieferten strukturelle Erkenntnisse zur künftigen Optimierung..

### **Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Das iGLUE-Projekt in der ersten Förderphase wurde von der Goethe-Universität Frankfurt (GUF) und der Technischen Universität Darmstadt (TUDa) geleitet. Das Projekt profitierte stark von der Einbindung in das Konsortium, das die interdisziplinäre Zusammenarbeit insbesondere bei der Entwicklung neuer Screening-Technologien, der Optimierung von MoG-Kandidaten und der Charakterisierung ihrer Wirkmechanismen fördert. Darüber hinaus ermöglichten Diskussionen mit Biotech- und Pharma-unternehmen innerhalb des PROXIDRUGS-Konsortiums kontinuierliches Feedback zur industriellen Relevanz und potenziellen Kommerzialisierung vielversprechender MoG-Kandidaten. Ein exploratives Pilotprojekt wurde mit Analyticon Discovery (Potsdam) zu potenziellen E3-Ligase-Liganden initiiert und ebnet den Weg für einen Beitritt von Analyticon Discovery zum PROXIDRUGS-Konsortium in der zweiten Förderperiode.

## Sachbericht zum Verwendungsnachweis

**Vorhabenbezeichnung:** PROXIDRUGS: Innovative molecular glues (iGLUE)

**Förderkennzeichen:** 03ZU1109EA, 03ZU1109EB

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.10.2021 – 31.12.2024

**Zuwendungsempfänger:** Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Technische Universität Darmstadt

**Assoziierte Partner:** Merck Healthcare KGaA  
AbbVie Germany GmbH & Co. KG

**Verantwortliche:** Ivan Dikic (GUF), Felix Hausch (TUDa)

**Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor**

### Teil II: Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)

**Abschnitte in rot sind vertraulich und dürfen nicht veröffentlicht werden!**

#### 1. Avisierte Ziele der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Das iGLUE-Projekt (Innovative Molecular Glues) ist Teil des Zukunftsclusters PROXIDRUGS und verfolgt das Ziel, molekulare Glues (MoGs) als neuartige pharmakologische Modalität systematisch zu erforschen und weiterzuentwickeln. Molekulare Glues sind kleine Moleküle, die gezielt neue Protein-Protein-Interaktionen induzieren und so biologische Prozesse modulieren können. Einige natürliche MoGs – etwa Lenalidomid, das erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt wird – sind bereits bekannt; systematische Methoden zur Identifizierung neuer MoGs existieren jedoch bislang nicht. iGLUE schließt diese Lücke, indem innovative Screening-Ansätze entwickelt werden, um neue MoGs zu finden, ihre Wirkmechanismen aufzuklären und aussichtsreiche Wirkstoffkandidaten für therapeutische Anwendungen zu optimieren.

Das Projekt will insbesondere für schwer zugängliche Zielproteine neue MoGs identifizieren und charakterisieren. Ein Schwerpunkt liegt auf der mechanistischen Aufklärung ihres Zusammenspiels mit E3-Ligasen und anderen zellulären Regulatoren. Gefundene MoGs werden hinsichtlich Wirksamkeit, Selektivität und pharmakologischer Eigenschaften optimiert. Zudem erforscht iGLUE neuartige Klassen von MoGs, insbesondere FKBP12-assistierte molecular glues (FaMoGs), als potenziell zukunftsweisende Pharmakologien. Langfristig soll

mindestens ein fortgeschrittener FaMoG-Kandidat in einem relevanten Zellmodell validiert werden, um einen Proof-of-Concept für die künftige Arzneimittelentwicklung zu liefern..

### Ziele von iGLUE in der ersten Förderphase waren es

- die Aufklärung des Wirkmechanismus von Indirubin-Derivaten als potenzielle molecular glues (iMoGs),
- die Entwicklung von zellbasierten Screening-Methoden zur Identifizierung von neuen molecular glues (nMoGs)
- das Screening und die Charakterisierung Indirubin-basierter und neuer ATP-kompetitiver MoGs sowie das Screening von Bibliotheken chemischer Naturprodukte
- die Evaluierung des Potenzials von FKBP12-assistierten molecular glues (FaMoGs) als neue pharmakologische Modalitäten
- Ein explizites Ziel ist die Entwicklung von mindestens einem fortgeschrittenen FaMoG, der einen proof-of-concept in einem relevanten zellulären Modellsystem erlaubt.

### Ziele des Arbeitspakets AP1: Entwicklung von Indirubin-Derivaten als potenzielle molecular glues

**AP1** sollte potente, auf Indirubin basierende molecular glues identifizieren, die Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie gezielt abbauen. Geplant war ein High-Content-Screening zur Protein-degradation und die Validierung der verantwortlichen E3-Ligase. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen Indirubin-Derivaten und dem Pflanzenhormon Auxin wurde ein entsprechender Wirkmechanismus vermutet. Zur Bestätigung sollten fluoreszenz-mikroskopische Analysen, Massenspektrometrie und Kristallographie eingesetzt werden. Ein zentrales Ziel war das detaillierte Bindungsmodell des Indirubin-Derivats E738 an SMAD3. Erwartete Meilensteine waren die Identifikation aktiver Indirubin-Derivate, die Validierung der beteiligten E3-Ligase und die Modellierung der Bindungsinteraktion zur weiteren Wirkstoffoptimierung.

### Ziele des Arbeitspakets AP2: Entwicklung von neuartigen molecular glues

**AP2** zielte darauf ab, neue Screening-Ansätze zur Identifizierung bislang unbekannter MoGs zu etablieren. Kernstück war ein zellbasierter Assay (CRISPR-HiBiT oder GFP-Reporter), mit dem Proteinabbau verfolgt werden kann. Durch Screening umfangreicher Chemiebibliotheken, insbesondere natürlicher Produkte, sollten neue MoG-Kandidaten entdeckt werden. Identifizierte Verbindungen würden anschließend mittels Proteomik charakterisiert, um Zielproteine und Wirkmechanismus aufzuklären. Erwartete Meilensteine umfassten den Abschluss des Screenings und die Analyse neu entdeckter Leitstrukturen für weiterführende Studien.

Ziele des Arbeitspakets AP3: Entwicklung von FKBP12-assistierten molecular glues

**AP3** konzentrierte sich auf die Identifizierung und Optimierung von FKBP12-assistierten molecular glues (FaMoGs). Vorgesehen war ein Screen nach FKBP12-Liganden, die Ternärkomplexe mit Zielproteinen bilden. Die Bindungseigenschaften dieser FaMoGs sollten in ihrer Affinität und Spezifität verbessert werden. Zusätzlich sollte ein nanoBRET-Assay entwickelt werden, um FaMoG-Interaktionen in lebenden Zellen zu analysieren. Ein zentrales Ziel bestand darin, mindestens einen FaMoG-Kandidaten in einem Zellmodell zu validieren und Patente auf vielversprechende Verbindungen anzumelden.

Ziele des Arbeitspakets AP4: Massenspektrometrische Analyse von FaMoGs

**AP4** widmete sich der Validierung von Ternärkomplexen, die FKBP12-basierte MoGs mit Zielproteinen bilden, mittels native Massenspektrometrie. Über integratives Struktur-modellieren sollten Bindungskonformationen vorhergesagt und so wichtige Einblicke in die molekulare Architektur gewonnen werden. Ziel war es, mindestens fünf FaMoG-Komplexe strukturell hochaufgelöst zu modellieren und umfassende Daten zu Stabilität und biochemischen Eigenschaften zu sammeln.

## 2. Ablauf des Vorhabens, Ergebnisse, Verwertung

### AP1: Entwicklung von Indirubin-Derivaten als potenzielle molecular glues

Jüngste Fortschritte in der Targeted-Protein-Degradation (TPD) haben zu transformativen Therapieansätzen geführt, insbesondere durch die Entwicklung von *Proteolysis-Targeting Chimeras* (PROTACs). Diese heterobifunktionellen kleinen Moleküle verbinden einen E3-Ligase-Rekrutierer mit einem Liganden, der an das Zielprotein (protein of interest, POI) bindet, und bilden so einen ternären Komplex, der den Transfer von Ubiquitin auf das POI erleichtert. Nach der Ubiquitinierung wird das POI vom 26S-Proteasom, der zentralen Maschinerie des Proteinumsatzes, erkannt und degradiert. Die Effektivität von PROTACs ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass sie auf die Verfügbarkeit spezifischer E3-Ligasen in unterschiedlichen zellulären Kontexten angewiesen sind (Abbildung 2A).

#### Abbildung 1: < VERTRAULICH >

Der TGF $\beta$ /SMAD-Signalweg ist während der Entwicklung vielzelliger Organismen und für die Gewebemöostase essenziell für Zellwachstum, Differenzierung, Migration und interzelluläre Kommunikation. Eine Fehlregulation dieses Signalwegs ist mit zahlreichen Pathologien

assoziiert – darunter Entwicklungsstörungen, Immunfehlregulation, fibrotische Erkrankungen und Krebs.

In unseren früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass E738 den Abbau von SMAD2/3 sowohl in Zellkulturen als auch in Xenopus-Modellen wirksam auslöst. Diese Degradation wurde durch Behandlung mit dem Proteasom-inhibitor MG132 spezifisch aufgehoben. <VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

Teile dieser Arbeit wurden 2022 im Journal of Cell Biology veröffentlicht.

## **Pro(teasome-targeting) Degradern (ProGraders)**

### **Abbildung 2: <VERTRAULICH>**

Um die zellulären Mechanismen der Indirubin-vermittelten Degradation aufzuklären, führten wir eine proteomweite Analyse durch. <VERTRAULICH>

Angeregt durch aktuelle Fortschritte im Bereich der Targeted Protein Degradation (TPD) synthetisierten wir den ersten proteasomgerichteten Degradern – den sogenannten ProGrader –, <VERTRAULICH>.

Zusammenfassend etabliert unsere Arbeit Indirubin-Derivate als potente TPD-Wirkstoffe und positioniert unsere innovativen ProGrader als vielversprechende Alternativen zu herkömmlichen PROTACs. Zukünftig ist es unser vorrangiges Ziel, das ProGrader-Verfahren weiter zu vertiefen und seine klinische Anwendbarkeit zu evaluieren.

<VERTRAULICH>

### **AP2: Entwicklung von neuartigen molecular glues**

Molecular-Glue-(MG)-Degradern sind kleine chemische Moleküle, die neuartige Ligase-Substrat-Interaktionen induzieren und gezeigt haben, nicht-ligandierbare Proteine abzubauen. Die Entdeckung von MGs war überwiegend zufällig; in den letzten Jahren haben jedoch chemische Screenings neuartige MGs identifiziert. MG-Degradern wirken, indem sie Cullin-RING-Ligasen (CRLs) chemisch umlenken. Unter physiologischen Bedingungen hängt die Aktivität der meisten CRLs von der reversiblen Anheftung des ubiquitinähnlichen Proteins NEDD8 an das jeweilige Cullin-Gerüst ab. Kürzlich wurde gezeigt, dass UBE2M-Mutationen durch Inaktivierung mehrerer CRLs, einschließlich CRL4CRBN und CRL2VHL, eine Resistenz gegenüber bekannten Small-Molecule-Degradern verursachen.

Um neuartige molecular glues zu identifizieren, führten wir einen chemischen Screen durch, der die unterschiedliche Viabilität von <VERTRAULICH>-Zellen gegenüber einer Bibliothek von mehr als 5 000 Verbindungen – <VERTRAULICH> – untersuchte.

Hits aus dem Screen wurden anschließend mittels eines umfassenden Multi-Omics-Ansatzes weiter analysiert.

**Abbildung 1:** <VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>. Insgesamt identifizierten wir zwölf potenzielle molecular-glue-artige Verbindungen (DL01–DL12, **Abbildung 3**).

**Abbildung 2:** <VERTRAULICH>

Zur weiteren Charakterisierung dieser Verbindungen konzentrierten wir uns auf DL05 und DL06, zwei Struktur-analoga mit geringfügigen chemischen Unterschieden. <VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

In der nächsten Förderperiode werden wir uns auf den Wirkmechanismus sowie die biophysikalische und strukturelle Charakterisierung der identifizierten molecular glues konzentrieren.

### **AP3: Entwicklung von FKBP12-assistierten molecular glues**

Es wurden zunächst fünf Primär-Screens mit den Substanzen der AK Hausch-internen FKBP-Liganden-Bibliothek für die Proteine VCB, <VERTRAULICH>, sowie CRBN durchgeführt. <VERTRAULICH>. Für VCB wurden die Proteine VHL, EloB und EloC koexprimiert, der stabile Komplex über IMAC und SEC aufgereinigt und durch Fluoreszenzpolarisation auf Funktionalität überprüft. CRBN wurde direkt nach IMAC-Reinigung verwendet. Alle Proteine waren mit einem GST-Tag versehen.

Für VCB und CRBN waren bifunktionale PROTACs vorhanden, die wir als Positivkontrolle einsetzen. In beiden Fällen konnten wir so die korrekte Funktionsweise des Assays nachweisen.

<VERTRAULICH>.

Der bis dahin verwendete Screening-Assay war nur für Zielproteine anwendbar, die mit einem GST-Tag versehen waren. Um einen breiteren Zugang potentiellen Zielproteinen zu erhalten, sollte Bedingungen gefunden werden, die auch für Zielproteine mit einem His-Tag funktionieren. Dafür musste zunächst das Konstrukt für das Adaptor-Protein GFP-FKBP12 gewechselt werden, da dies in diesem Fall selbst keinen His-Tag tragen durfte. Statt dessen wurde ein SUMO-GFP-FKBP12-Konstrukt kloniert, das eine rekombinante Überexpression in E.Coli erlaubte und das nach Aufreinigung und SUMO-Spaltung Tag-freies GFP-FKBP12 in hohen Ausbeuten ermöglichte. Die Funktionalität dieses Konstruktes bzgl. seiner Eignung als Adaptor-Protein wurde mit dem Partnerprotein FRB und dem bekannten Molecular Glue Rapamycin sichergestellt.

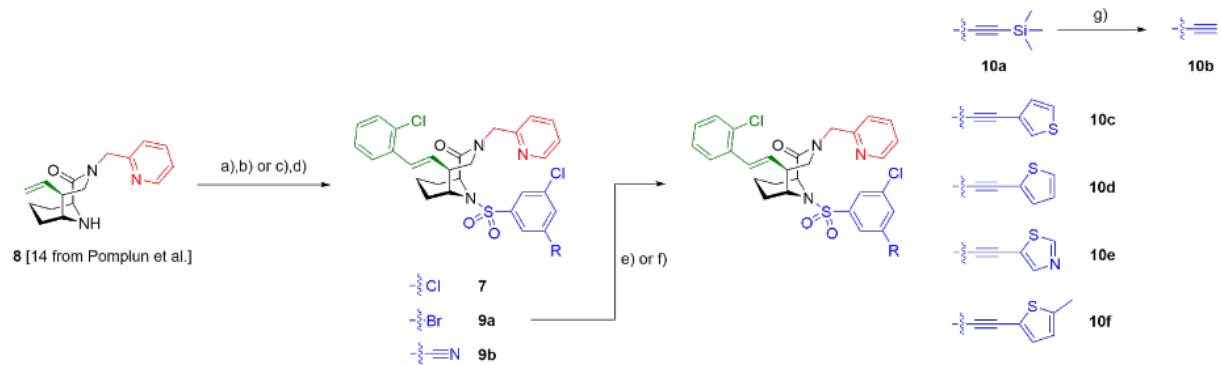
Mit diesem neuen Assay-System wurden zunächst zwanzig Primär-Screens mit den Substanzen der AK Hausch-internen FKBP-Liganden-Bibliothek durchgeführt. <VERTRAULICH>. Davon wurden die Hälfte der Protein selbst exprimiert und gereingt, die übrigen Proteine wurden von Projektpartnern innerhalb von PROXIDRUGS oder von externen Kooperationspartnern zu Verfügung gestellt.

Alle primären Hits wurden in Dosis-Wirkungskurven überprüft. Substanzen, die in mehreren Assays auftraten oder in Kontrollexperimenten ohne Ziel anschlugen, wurden ausgemustert. Da in den Primärscreens nur schwache Aktivitäten zu erwarten waren, mussten die reproduzierten Hits in orthogonalen Sekundärassays bestätigt werden. Hierfür wurde zunächst ein Fluoreszenzpolarisationsassays basierend auf fluoreszenz-markiertem FKBP12 aufgebaut. Hierfür wurde eine FKBP12-Konstrukt kloniert, exprimiert und gereinigt, bei dem alle natürlich vorkommenden Cysteine eliminiert wurden und ein einziges C-terminales Cystein eingeführt wurde. Dieses Cystein konnte anschließend selektiv mit einem Cystein-reaktiven Fluorescein-Derivat markiert werden. Da das so markierte FKBP12 sehr klein ist, kann die Bindung an Partnerproteine durch eine Änderung der Fluoreszenzpolarisierung verfolgt werden. Als zweiten Validierungsassay wurde eine Photocrosslinking-Assay aufgebaut. Hierfür wurden zunächst verschiedene FKBP12-Konstrukte kloniert, exprimiert und gereinigt, die nur einziges Cystein an verschiedenen Stellen rund um die Bindungstasche von FKBP12 trugen. Diese Cysteinreste wurden anschließend mit einem selbst hergestellten photoaktivierbaren Reagenz derivatisiert. Die so hergestellten FKBP12-Photocrosslinker-Konstrukte wurden nun dahingehend untersucht, ob sie in Anwesenheit von Molecular Glues einen licht-induzierten Crosslink zu den Partnerproteinen eingehen können.

Für das Partnerprotein STAT4 konnten so Substanzen gefunden werden, die in allen Assays Molecular Glue-Effekte zeigte.

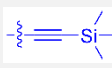

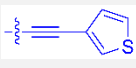
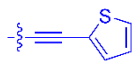
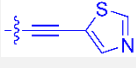
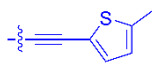
Basierend auf dem für die FRB-Domäne von mTOR gefundenen Molecular Glue und der anschließend gelösten Struktur des ternären Komplexen synthetisierten wir etliche Analoga

(Abbildung 3), um den Molecular Glue-Effekt weiter zu verstärken. Diese Analoga wurden anschließend in einem FP-Assay für Bindung an KBP12 sowie in einem HTRF-Assay zur Induktion von FKBP12-FaMoG-FRB-Komplexen vermessen. Ferner wurden die Substanzen in einem nanoBRET-Assay zur Bestimmung der intrazellulären FKBP12-Belegung gemessen (Tabelle 1).



**Abb. 3 Synthese von Derivaten von FKBP12-FRB-Molecular Glues:** a) sulfonyl chloride, DIPEA, MeCN, rt, compound **7**: 18, 48%, **9b**: 16 h, 49%; b) 1-bromo-2-chlorobenzene, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>•CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 100°C, compound **7**: dioxane, 40 h, 57% yield, **9b**: DMF, 18 h, 25% yield; c) 1-bromo-2-chlorobenzene, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>•CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dioxane:H<sub>2</sub>O=20:1, 100°C, 19 h, 78% yield; d) 3-bromo-5-chlorosulfonyl chloride, DIPEA, MeCN, rt, 46 h, 55% yield; e) alkyne, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>•CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, TMEDA, 80°C, **10c**: 2,5 h, 68% yield, **10d**: 3 h, 55% yield; f) TMS-alkyne, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>•CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, TMEDA:DMF=1:1, 80°C, **10e**: 22 h, 53%, **10f**: 14,5 h, 75%; g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 2,5 h 94% yield.

No.	huma n	FRB with FKPB FKPB 12- FSM, IC50 [nM] <sup>4</sup> 1	FRB FKBP1 2 nanoB RET IC50 [nM] <sup>42</sup>	
7	6.3 ± 2.2	0.039 ± 0.006	30.3 ± 1.5	
9a	5.8 ± 1.1	56.3 ± 10.3	40.6 ± 5.3	
9b	3.6 ± 1.1	54.0 ± 6.2	47.8 ± 10.7	

10a	11 ±	<b>49.7 ±</b>	405 ±	
	1.5	<b>4.7</b>	219	
10b	13 ±	<b>63.1 ±</b>	101 ±	
	2.1	<b>6.1</b>	19	
10c	4.1 ±	<b>0.56 ±</b>	313.7 ±	
	0.6	<b>0.03</b>	21.3	
10d	7.2 ±	0.63 ±	<b>799 ±</b>	
	1.7	<b>0.06</b>	183	
10e	4.7 ±	1.82 ±	49.2 ±	
	1.8	<b>0.11</b>	4.0	
10f	4.8 ±	0.18 ±	<b>1325 ±</b>	
	0.8	<b>0.02</b>	195	

**Tab. 1:** Affinitätsdaten für die Bindung der Verbindung an gereinigtes menschliches FKBP12, bestimmt durch einen Fluoreszenzpolarisationsassay (FP), Affinitätsdaten für die Bindung des FKBP12-Verbindungskomplexes an FRB, bestimmt durch einen Fluoreszenzpolarisationsassay (FP) und NanoBRET-Daten für intrazelluläres FKBP12 Besetzung für R2-substituierte Verbindungen

Zusammen mit der Arbeitsgruppe Lermyte konnten wir die Ausbildung der ternären Komplexe durch native Massenspektrometrie nachweisen. Dabei konnte insbesondere auch der initial Hit (Substanz 7 in Tabelle 1) nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass native Massenspektrometrie als robuster Validierungsassay und ggf. sogar für das primäre Screening eingesetzt werden könnte.

Den von uns entwickelten primären Screening-Assay auf HTRF-Basis setzen wir ferner für das Screening von insgesamt >60 gereinigten Proteine ein. Dabei konnten wir in 4% der Fälle validierte FKBP12-basierte Molecular Glues identifizieren. Das vielversprechendste Zielprotein war dabei BRD4. Von dem Hit für dieses Proteine wurden >20 Analoga synthetisiert und biochemisch in einer Reihe von Assays getestet. So konnte die Potenz auf <10µM gesteigert werden

<VERTRAULICH>

<VERTRAULICH>

#### AP4: Massenspektrometrische Analyse von FaMoGs

Drei FKBP12-assistierte molecular glues wurden mit native Massenspektrometrie validiert – **<VERTRAULICH>**. Dazu wurde ein zweistufiges Verfahren eingesetzt. Im ersten Schritt detektierten wir ein Ion mit der erwarteten Masse des ternären FKBP12-Glue-Target-Komplexes in einer Probe, die alle drei Komponenten enthielt (und nicht in Proben, die nur FKBP12 und das Zielprotein enthielten). Im zweiten Schritt wurde dieses Ion in der Gasphase isoliert und anschließend kollisionsinduziert aktiviert, um den Komplex zu zerlegen; so konnten wir verifizieren, dass er aus den drei erwarteten Komponenten bestand (die Ergebnisse für FKBP12-MG-FRB sind als Illustration in Abbildung 1 dargestellt).

**Abbildung 1. <VERTRAULICH>**

**<VERTRAULICH>**

**<VERTRAULICH>**

**<VERTRAULICH>**

**Abbildung 2. <VERTRAULICH>**

### **3. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Das iGLUE-Projekt wurde in der ersten Förderphase von der **Goethe-Universität Frankfurt (GUF)** und der **Technischen Universität Darmstadt (TUDa)** geleitet. Das Vorhaben profitierte in hohem Maße davon, Teil des Konsortiums zu sein, das die interdisziplinäre Zusammenarbeit fördert – insbesondere bei der Entwicklung neuer Screening-Technologien, der Optimierung von Molecular-Glue-Kandidaten und der Charakterisierung ihrer Wirkmechanismen.

Das Projekt arbeitet außerdem mit Georg Winter (CEMM Wien) zusammen, einem Experten für das Design von niedermolekularen Wirkstoffen. Darüber hinaus ermöglichten Gespräche mit Biotech- und Pharmaunternehmen innerhalb des PROXIDRUGS-Konsortiums eine kontinuierliche Rückmeldung zur industriellen Relevanz und zum Kommerzialisierungspotenzial vielversprechender Molecular-Glue-Kandidaten.

Ein exploratives Pilotprojekt wurde gemeinsam mit **Analyticon Discovery** (Potsdam) zu potenziellen E3-Ligase-Liganden gestartet; dies ebnet den Weg dafür, dass Analyticon Discovery in der zweiten Förderperiode dem PROXIDRUGS-Konsortium beitrifft.

#### 4. Budget

Das Projekt wurde innerhalb des geplanten Budgets umgesetzt. Bei der Wirkstoffentwicklung traten einige Verzögerungen auf, die jedoch nicht zu nennenswerten Budgetabweichungen führten. Die ursprünglich vorgesehenen wissenschaftlichen Meilensteine wurden weitgehend erreicht, wobei einige Arbeiten in die zweite Förderphase übergehen.

**Spezifische Erläuterungen für die Goethe-Universität Frankfurt (VERTRAULICH):**

<VERTRAULICH>

**Spezifische Erläuterungen für die Technische Universität Darmstadt (VERTRAULICH):**

<VERTRAULICH>