

KRAS 及其抑制剂的研究进展

李慧丽, 姜飞, 任继威, 陆涛*, 陈亚东**

(中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 211198)

[摘要] *RAS* 是人类癌症中最常发生突变的致癌基因, 而 *KRAS* 则是 *RAS* 家族中最常发生突变的亚型, 其中多数为 12 位密码子的突变。突变之后的 *KRAS* 使细胞的生长、增殖不受控制, 进而导致癌症的发生与发展。尽管经过了 30 多年的努力, 但直接靶向 *KRAS* 活性位点的药物开发均以失败告终。由于 *KRAS* 与 GTP 的亲合力极强, 同时细胞中 GTP 浓度较高, 以至于使 *KRAS* 成为“不可成药”靶点。近期, 针对突变的 *KRAS* G12C 特异性共价抑制剂在临床试验中取得了突破性进展, 为 *KRAS* 抑制剂的成药性提供了临床证据。综述 *KRAS* 的结构功能及其小分子抑制剂的设计和临床研究概况, 着重介绍具有代表意义的 *KRAS* G12C 抑制剂和其作为抗肿瘤药物的最新研发进展, 为以 *KRAS* 为靶点的药物开发提供研究思路。

[关键词] *KRAS*; *KRAS* G12C 抑制剂; 变构位点; 组合疗法

[中图分类号] R918; R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2020) 01-0043-13

Research Advances on KRAS and Its Inhibitors

LI Huili, JIANG Fei, REN Jiwei, LU Tao, CHEN Yadong

(State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] *KRAS* is the most frequent mutation subtype of the *RAS* family, which is the most frequently mutated oncogene in human cancer. Most of the mutations are at codon 12. *KRAS* causes uncontrolled cell growth after mutation, which in turn leads to the development and progression of cancer diseases. However, despite more than 30 years of effort, the drug discovery targeting *RAS* constantly fails due to its strong affinity with GTP and picomolar affinity towards guanosine substrates, rendering *RAS* undruggable. Recently, G12C-specific covalent inhibitors against mutations have made breakthroughs in clinical trials, providing clinical evidence for *RAS* drug-solvable targets. This review summarizes the structure and function of *KRAS* and design and clinical research of its small molecule inhibitors, with a focus on the study of recent advances on representative *KRAS* G12C inhibitors as a new approach to the development of antitumor drugs.

[Key words] *KRAS*; *KRAS* G12C inhibitors; allosteric sites; combination therapy

KRAS 蛋白 (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 是 *RAS* 蛋白 (rat sarcoma viral oncogene homolog) 家族中的重要一员, 该家族的其他 2 个成员分别是 *HRAS* 蛋白 (harvery rat sarcoma viral oncogene homolog) 和 *NRAS* 蛋白 (neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog)^[1], *KRAS* 蛋白是由 *KRAS* 基因编码的一种小 GTP 水解酶 (small GTPase), 是细胞生存和生长的重要调节蛋白^[2]。近期各大制药企业纷纷披露了 *KRAS* 抑制剂优异的临床试验结果, 使得以 *KRAS* 为靶点的药物开发进入爆发期, 吸引了广大研究者的注意。本文综述 *KRAS* 的结构功能及其小分子抑制剂的研究进展, 以期抗肿瘤药物的开发提供参

1 KRAS 蛋白概述

KRAS 蛋白具有激活和失活 2 种状态 (见图 1), 当 *KRAS* 与鸟苷三磷酸 (GTP) 结合时呈激活状态, 而与鸟苷二磷酸 (GDP) 结合时呈失活状态^[3]。*KRAS* 在激活和失活状态之间的转换受鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEF) 和 GTP 酶激活蛋白 (GAP) 调节。GEF 催化 *KRAS* 与 GTP 结合, 使 *KRAS* 处于激活状态; 而 GAP 使与 *KRAS* 结合的 GTP 水解成为 GDP, 进而使 *KRAS* 锁定在失活状态^[4]。

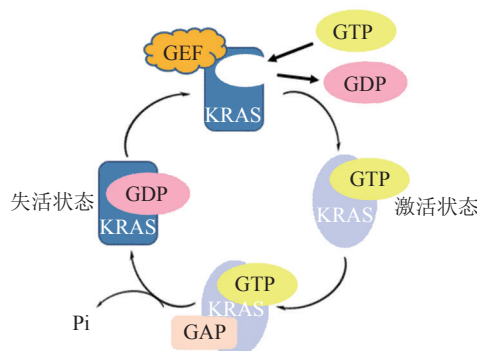


图 1 *KRAS* 激活与失活状态

Figure 1 Activation and inactivation of *KRAS*

接受日期: 2019-12-11

*通讯作者: 陆涛, 教授, 博士生导师;

研究方向: 新药分子设计与合成;

Tel: 025-86185186; E-mail: lutao@cpu.edu.cn

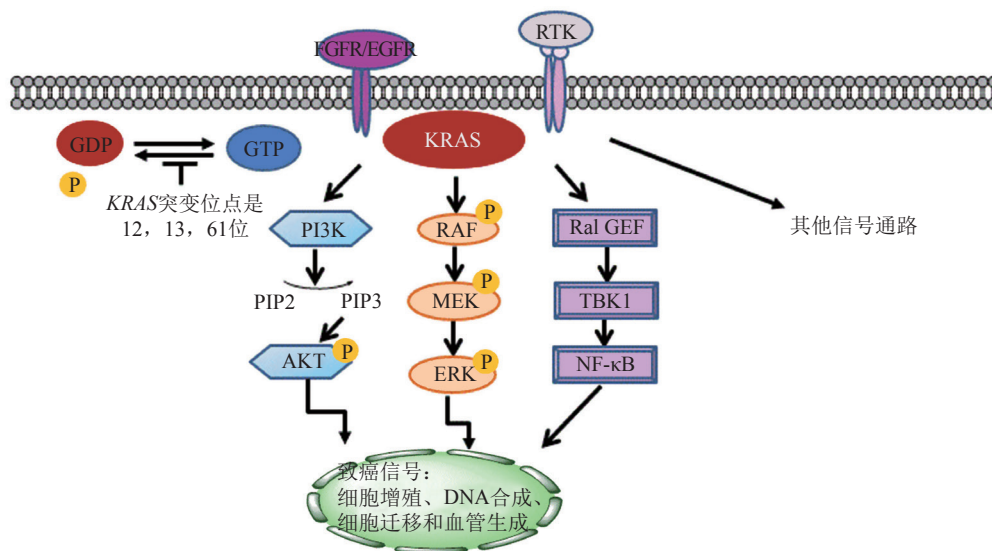
**通讯作者: 陈亚东, 教授, 博士生导师;

研究方向: 小分子靶向药物的设计和活性研究;

Tel: 025-86185153; E-mail: ydchen@cpu.edu.cn

KRAS 在大多情况下处于失活状态, 但其可以被上游的信号因子如表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激活^[5], 激活后的 KRAS 可进一步激活下游的多条信号通路, 如控制细胞生成的 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase, 胞内磷脂酰肌醇激酶) - AKT (protein kinase B, 蛋白激酶 B) - mTOR (mammalian target of rapamycin, 雷帕霉素靶蛋白) 信号通路^[6], 控制细胞增殖的 RAS (rat sarcoma viral oncogene homolog,

大鼠肉瘤病毒同源癌基因) - RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma, 快速加速的纤维肉瘤) - MEK (mitogen-activated protein kinase, 分裂原活化蛋白激酶) - ERK (extracellular regulated protein kinases, 细胞外调节蛋白激酶) 信号通路^[7], 以及控制细胞因子释放的 Ral-GEF (ras related protein-guanine nucleotide exchange factor, ras 相关蛋白鸟苷酸交换因子) 信号通路^[8-9] (见图 2), 这些信号通路在细胞生长、增殖和细胞因子释放等方面具有重要作用。



RTK: receptor tyrosine kinase (受体酪氨酸激酶); EGFR: fibroblast growth factor receptor (成纤维细胞生长因子受体); PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸); PIP3: inositol trisphosphate (三磷酸肌醇); TBK1: tank binding kinase 1 (tank 结合激酶 1); NF-κB: nuclear factor κB (核转录因子-κB)

图 2 KRAS 影响的信号通路

Figure 2 KRAS-affected signaling pathways

KRAS 是 RAS 家族中最常发生突变的亚型, KRAS 突变大概占 RAS 家族突变总数的 85%, HRAS 和 NRAS 仅发生少量突变, 多为个位数占比^[10]. KRAS 在多种癌症中均有突变 (见表 1), 其中胰腺癌突变率高达 90%, 结肠癌和肺癌 (大多为非小细胞肺癌) 分别约占 30%~50% 和 19%, 胆管癌约占 26%, 小肠癌、皮肤癌、膀胱癌和乳腺癌等癌症中也会发生突变^[11]. KRAS

基因中最常发生突变的位点是第 12、13 和 61 位的密码子, 其中以 12 位密码子的突变最为常见^[12]. 突变后的 KRAS 会影响其与 GAP 蛋白的结合能力, 从而抑制 GAP 诱导的 GTP 水解。随着 GTP 酶水解能力下降, GTP 逐渐积累, KRAS 更易与 GTP 结合, 进而使 KRAS 大多处于激活状态^[13]. 最终导致其下游的多条信号通路被激活, 诱发恶性肿瘤的发生与发展。

表 1 人类癌症中 RAS 突变比例^[10]

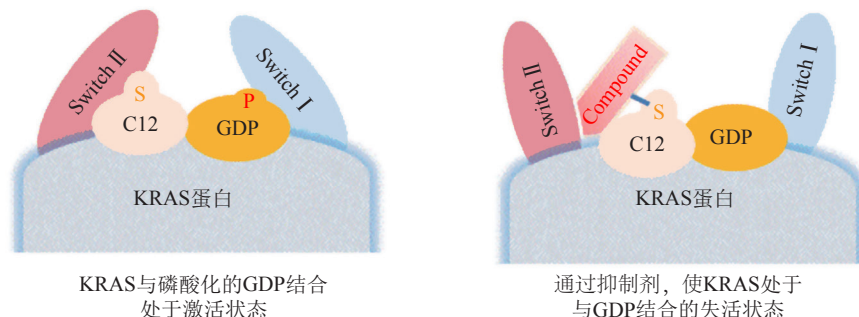
Table 1 Proportion of RAS mutation in human cancers

癌症类型	KRAS/%	HRAS/%	NRAS/%	3 种 RAS 亚型突变总数 /%
胰腺癌	90	0	<1	90
结直肠癌	30~50	1	6	42
小肠癌	35	0	<1	35
胆管癌	26	0	2	28
子宫癌	17	<1	5	22
肺癌	19	<1	1	20
皮肤癌	1	1	18	20
乳腺癌	8	9	2	19
膀胱癌	5	10	1	16

2 KRAS G12C 抑制剂的设计策略以及临床研究进展

KRAS 与 GTP (磷酸化的 GDP) 结合时, KRAS 活性构象蛋白表面的 Switch I 和 Switch II 处于闭合状态。当 KRAS 与 GDP 结合时, 不仅失去活性而且蛋白表面出现一些结合空腔^[14] (见图 3)。理论上, 设计小

分子靶向占据 GTP 结合位点, 就可以使 KRAS 稳定在失活构象。但是由于 KRAS 蛋白表面非常光滑, 且仅有一个与 GTP 结合的位点, 再加之其与 GTP 的亲合力非常强, 细胞中 GTP 浓度非常高, 使得直接靶向 GTP 结合位点的抑制剂极难发挥作用^[15]。尽管研究人员尝试研发了多种竞争性 GTP 小分子抑制剂, 但均未取得成效。



注: P 表示磷酸化, S 为硫原子

图 3 KRAS 与 GDP 结合构象

Figure 3 Conformation of KRAS and GDP

近年来, 对 KRAS 突变体的共价抑制剂的研究取得了较大进展。KRAS G12C 是一种常见的 KRAS 突变^[16], 当 12 位甘氨酸突变为半胱氨酸后, 有可能可以与小分子共价结合, 因此研发与此半胱氨酸结合的变构位点 (allosteric) 抑制剂具有较好的开发前景^[17]。加州大

学的 Ostrem 等^[18]首次报道了具有一定活性的 KRAS G12C 小分子抑制剂, 验证了研发共价小分子抑制剂的可行性, 从此开启了 KRAS G12C 共价小分子抑制剂研发的新篇章 (见表 2)。

表 2 进入临床的 KRAS G12C 小分子抑制剂

Table 2 Small molecule inhibitors of KRAS G12C in clinical application

化合物编号	研发公司	研发进展	适应证	开发策略	参考文献
BI-2852	勃林格殷格翰	临床前	肺癌、胃肠道癌	单用及联合 SHP2	[2]
AMG510	安进	临床 I/II 期	非小细胞肺癌, 结直肠癌	单用及联合 PD-1	[19]
MRTX-849	MIRATI	临床 I/II 期	非小细胞肺癌, 结直肠癌	单用及联合 SHP2	[20]
ARS-853	Wellspring	临床前暂停	NA	NA	[21]
ARS-1620	Wellspring	临床前	NA	NA	[22]
ARS-3248	Wellspring	临床 I 期	晚期实体瘤	单用	
未知	药明康德	临床前	NA	NA	

注: NA: 未知或未有文献报道; SHP2: SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 (含 SH2 结构域的酪氨酸磷酸酶 2); PD-1: programmed cell death protein 1 (程序性死亡受体 1)

其中安进公司开发的 AMG510 在不到 1 年的时间里就获得了良好的临床结果, 这也是首个公布临床试验数据的 KRAS G12C 抑制剂, 目前已经获得美国 FDA 批准用于治疗非小细胞肺癌以及结直肠癌^[19]。Mirati 公司研发的 KRAS G12C 抑制剂 MRTX849 在临床试验中也表现出良好的抗肿瘤活性^[20]。Wellspring 公司研发的 ARS-853 表现出较好的细胞活性, 但由于其药代动力学性质差, 不适合进行体内研究^[21]。随后他们研发了唑啉类新母核抑制剂 ARS-1620, 其对 KRAS G12C 显示出较好的活性以及选择性, 可快速使肿瘤消退, 具

有极大的开发潜力^[22]。2019 年 5 月, Wellspring 公司宣布美国 FDA 批准了 ARS-3248 的临床新药研究的申请, 强生公司将对其进行 I 期临床试验。而勃林格殷格翰 (Boehringer Ingelheim) 的相关研究表明^[2], BI-2852 能以纳摩尔级别与 KRAS 蛋白结合, 且对携带 KRAS 突变的肿瘤细胞均有抗增殖作用。除以上 KRAS G12C 小分子抑制剂外, 还有多个制药企业 (如辉瑞制药有限公司以及药明康德新药开发有限公司) 未公开专利保护的化合物。KRAS 这一曾经被认为“不可成药”的靶点, 迎来了新药开发的热潮。

3 KRAS G12C 小分子抑制剂

3.1 变构位点抑制剂

KRAS 变构位点抑制剂主要是通过改变 KRAS 蛋白结构或干扰其与核苷酸交换因子 (如 SOS 蛋白) 形成的蛋白-蛋白相互作用而发挥作用^[22]。当前研究最多的是 KRAS G12C 变构位点抑制剂, 这些变构配体与 KRAS G12C 的结合不会干扰鸟苷核苷酸底物位点, 克服了 KRAS G12C 与 GTP 结合力极强的缺点^[23]。本文将变构抑制剂按结构类型分为 5 类: 氨基乙酮类、喹唑啉类、四氢吡啶并嘧啶类、吡啶并嘧啶酮类以及吡啶类。

3.1.1 氨基乙酮类 Ostrem 等^[24]首次报道了 KRAS G12C 特异性抑制剂, 他们先通过二硫键碎片筛选得到了片段 **1**, 进一步结构优化得到了化合物 **2**。化合物 **2** 和 KRAS G12C 的共晶结构显示 (图 4 所示), 化合物

2 共价结合到 Cys12 巯基上, 并延伸到临近 Switch II (S-II P) 形成的空腔, 但 S-II P 空腔并未被充分占据, 更有效的共价结合基团可能有助于提高抑制剂活性。因此, 研究人员设计丙烯酰胺和乙烯基磺胺等亲电基团代替二硫基团, 获得了化合物 **3** 和 **4**。在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下孵育 24 h, 它们对 KRAS G12C 的抑制率可分别达 87% 和 100%。二者不仅能够有效占据 S-II P, 而且使 KRAS 更倾向于与 GDP 结合, 从而使 KRAS 更多地处于非活性状态。此外, 化合物 **3** 和 **4** 对癌细胞也具有一定的抗增殖作用。该研究首次通过化合物与 KRAS G12C 蛋白共晶体证明了占据 S-II P 结合位点在 KRAS G12C 驱动的癌症中的应用, 为 KRAS G12C 特异性共价抑制剂的研究和开发提供理论指导。

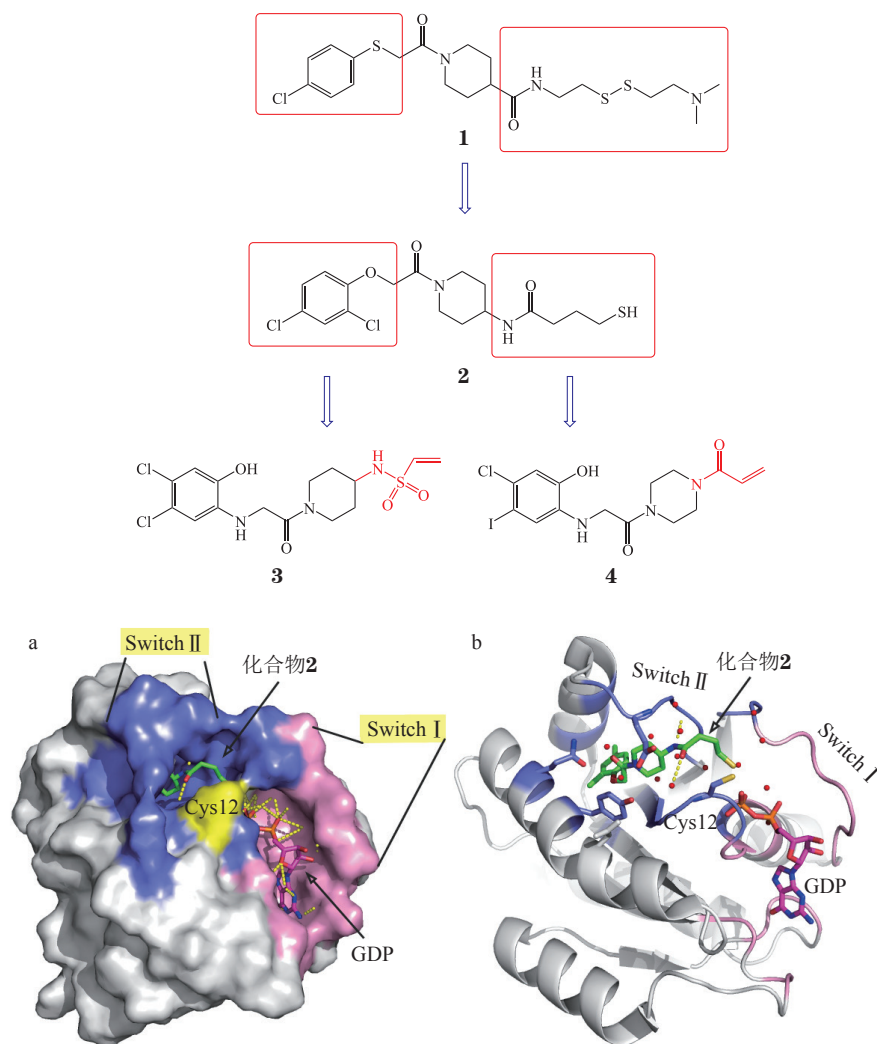


图 4 化合物 **2** 与 KRAS G12C 的共晶结构 (PDB ID: 4LUC)^[24]

Figure 4 X-ray co-crystal structure of compound **2** and KRAS G12C (PDB ID: 4LUC)

由于化合物 **4** 的细胞活性不佳, Patricelli 等^[25] 在此基础上开发了对非小细胞肺癌细胞株 (H358) 活性更优异的 KRAS G12C 抑制剂。经延长化合物 **4** 的烯丙基酰胺得到了化合物 **5** (ARS-107), 其对 KRAS G12C 突变的肺癌细胞有微弱的活性 ($IC_{50}=63 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 显示出一定的抗肺癌细胞增殖潜力。此外, 由于化合物 **5** 的苯环上 5 位氯对活性影响较大, 对苯环进行结构优化获得了化合物 **6** (ARS-853), 其活性得到了显著提高 (IC_{50}

$=1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。进一步分析化合物 **6** 与 KRAS 的共晶结构发现 (如图 5 所示), 化合物 **6** 的丙烯酰胺能与 12 位半胱氨酸形成共价键, 且延伸到 Switch II 区域; 芳香环占据疏水性区域, 环丙基与周围的氨基酸形成了较强的范德华力作用。细胞活性数据表明, 化合物 **6** 能够诱导细胞凋亡, 延缓细胞生长, 且对多种癌细胞具有抑制活性^[26]。此外, 化合物 **6** 选择性地与非活性状态的 GDP-KRAS 结合, 使 KRAS 锁定在失活状态。

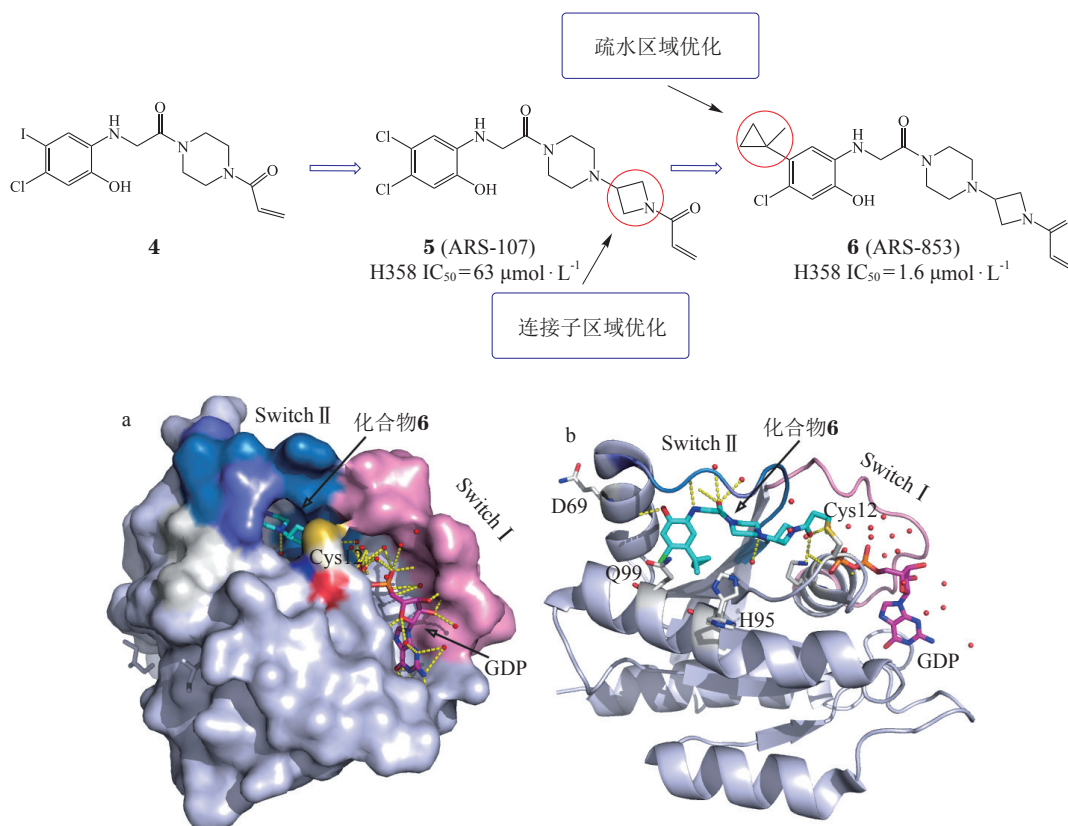


图 5 ARS-853 与 KRAS G12C 的共晶结构 (PDB ID: 5F2E)^[25]

Figure 5 X-ray co-crystal structure of ARS-853 and KRAS G12C (PDB ID: 5F2E)

3.1.2 喹唑啉类 ARS-853 (化合物 **6**) 虽表现出较好的细胞活性, 但其药代动力学性质较差, 不适于进行体内的药效评估。此外 ARS-853 系列化合物结构修饰较为有限, 限制了其进一步的药效改善。该系列母核的邻氨基酚和连接子区域是代谢位点, 也是血浆稳定性和药代动力学较差的主要原因。因此, Janes 等^[29] 将重点转移到设计结构独特的母核上, 头部丙烯酰胺直接连接氮甲基哌嗪, 缩短连接子的距离, 同时用喹唑啉取代邻氨基苯酚, 使其恰好占据疏水区域, 开发了喹唑啉母核类化合物^[27], 克服了 ARS-853 的缺点, 具有更好的成药性特征。Wijeratne 等^[28] 首先从该专利中检索到化合物 **8**, 细胞测试结果表明, 化合物 **8** 对多种肿

瘤细胞均展现出较好的抑制效果。

Janes 等^[29] 对化合物 **8** 的对应异构体 **9** (ARS-1620) 进行了更加深入的研究。从化合物 **9** 与 KRAS 的共晶结构发现 (如图 6 所示), 化合物 **9** 的优势构象更加刚性, 与 H95 形成了额外的关键作用力。化合物 **9** 与 KRAS G12C 的结合速率 ($1100 \pm 200 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 比化合物 **8** 快了近 1 000 倍 ($1.2 \pm 0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。此外, 化合物 **9** 的细胞活性 ($IC_{50}=0.150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 也得到了很大的提高。进一步的体内研究揭示了其口服生物利用度高 ($F > 60\%$)、药理特性以及血液稳定性均较好。同时, 该化合物对 KRAS G12C 具有高效性和选择性, 可快速、持续地作用于体内靶点以诱导肿瘤消退。该研究提供

了体内证据, 揭示以 ARS-1620 为代表的新一代 KRAS G12C 抑制剂的巨大治疗潜力。

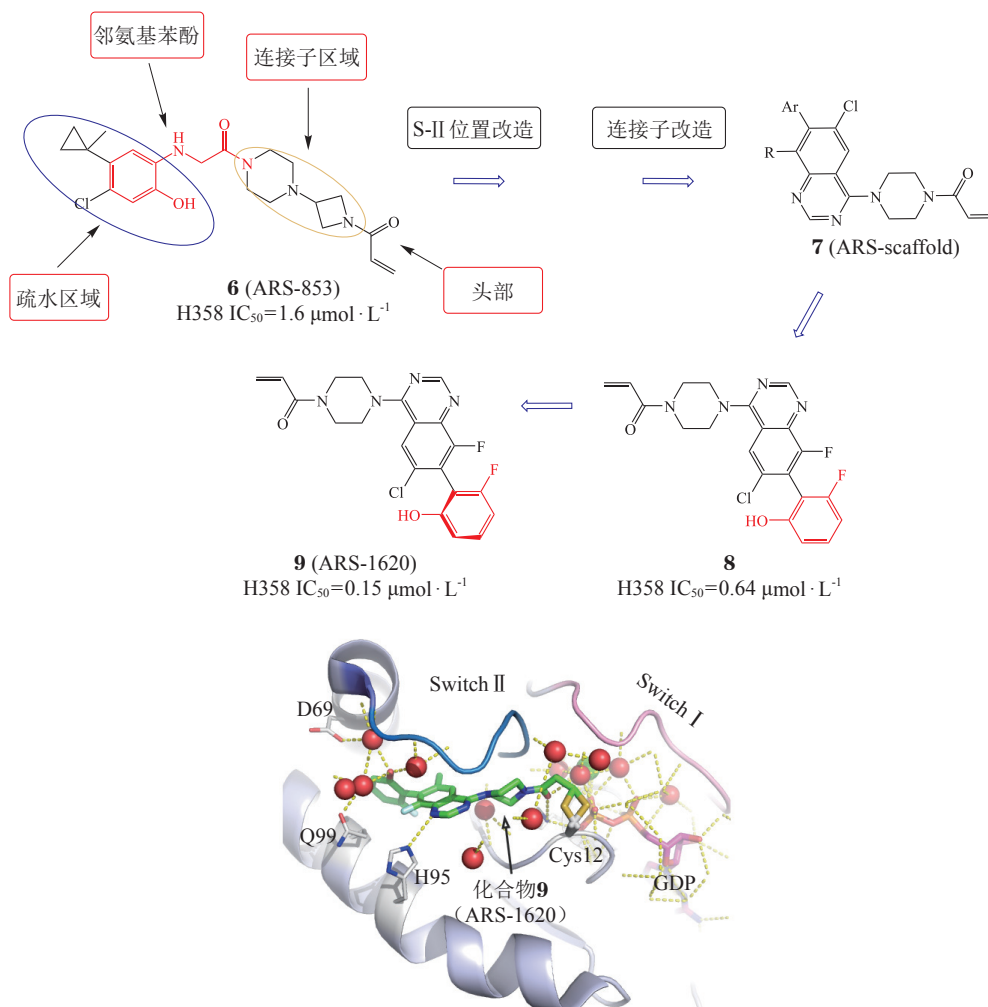


图 6 ARS-1620 与 KRAS G12C 的共晶结构 (PDB ID: 5V9U) [29]

Figure 6 X-ray co-crystal structure of ARS-1620, compound 14 and KRAS G12C (PDB ID: 5V9U)

Zeng 等^[30] 基于 S-II P 结合位点对专利化合物 10 进行了进一步的结构优化, 得到了另一种喹啉类化合物。通过在喹啉 2 位引入氨基酰胺得到化合物 11 (1_AM) 和 12 (2_AM)。与化合物 10 相比, 化合物 11 可使 GTP 与 KRAS 的结合能力降低约 80%, 并能有效地抑制下游 ERK 的磷酸化。除此之外, 氨基酰胺的引入还增强了对 KRAS G12C 的选择性。在化合物 11 的基础上, 将苯环换成萘环, 同时保留氨基酰胺, 得到了化合物 13 (3_AM) 和 14 (4_AM), 均具有较好的细胞活性 (IC_{50} 分别为 1.7 和 0.73 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3.1.3 四氢吡啶并嘧啶类 Fell 等^[31] 基于结构筛选得到了四氢吡啶并嘧啶类化合物 15, 在 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下化合物 15 对 KRAS G12C 的抑制率仅为 13%。进一步优化得到了化合物 16, 其在 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下的抑制率提高至 99%, 细胞活性为 $IC_{50}=7.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。鉴于嘧啶环 2 位对活性

影响较大, 在 2 位进行取代得到化合物 17 和 18, 化合物 17 与 KRAS G12C 的共晶结构如图 7 所示。与化合物 16 相比化合物 17 和 18 细胞活性得到了明显提升, IC_{50} 分别为 540 和 70 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时, 二者能够抑制 KRAS 下游效应因子 (如 ERK) 的磷酸化。化合物 18 的体内药效表明, 腹腔给药 5 d 可使肿瘤迅速消退, 25 d 后肿瘤完全消除。此外, 基于 LC-MS (液相色谱-质谱) 的检测显示, 给药后, 肿瘤组织中化合物 18 与 KRAS G12C 的结合率可持续大于 65%。最重要的是, 小鼠对化合物 18 具有较好的耐受性, 未出现体质量减轻或其他不良症状等副作用。因此, 以化合物 18 为代表的四氢吡啶并嘧啶类 KRAS G12C 共价变构抑制剂具有良好的临床应用前景。

近期, Mirati 公司的四氢吡啶并嘧啶类 KRAS G12C 抑制剂 MRTX849 (结构尚未报道) 在临床试验中也表现出良好的疗效。MRTX849 最初是由 Mirati 与

Array 生物医药公司联合发现的, 具有优异的细胞活性, IC_{50} 高达 $1 \sim 20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与报道的其他 KRAS 抑制剂

相比, MRTX849 具有抗肿瘤活性好、口服利用度高、半衰期长等良好的成药特性。

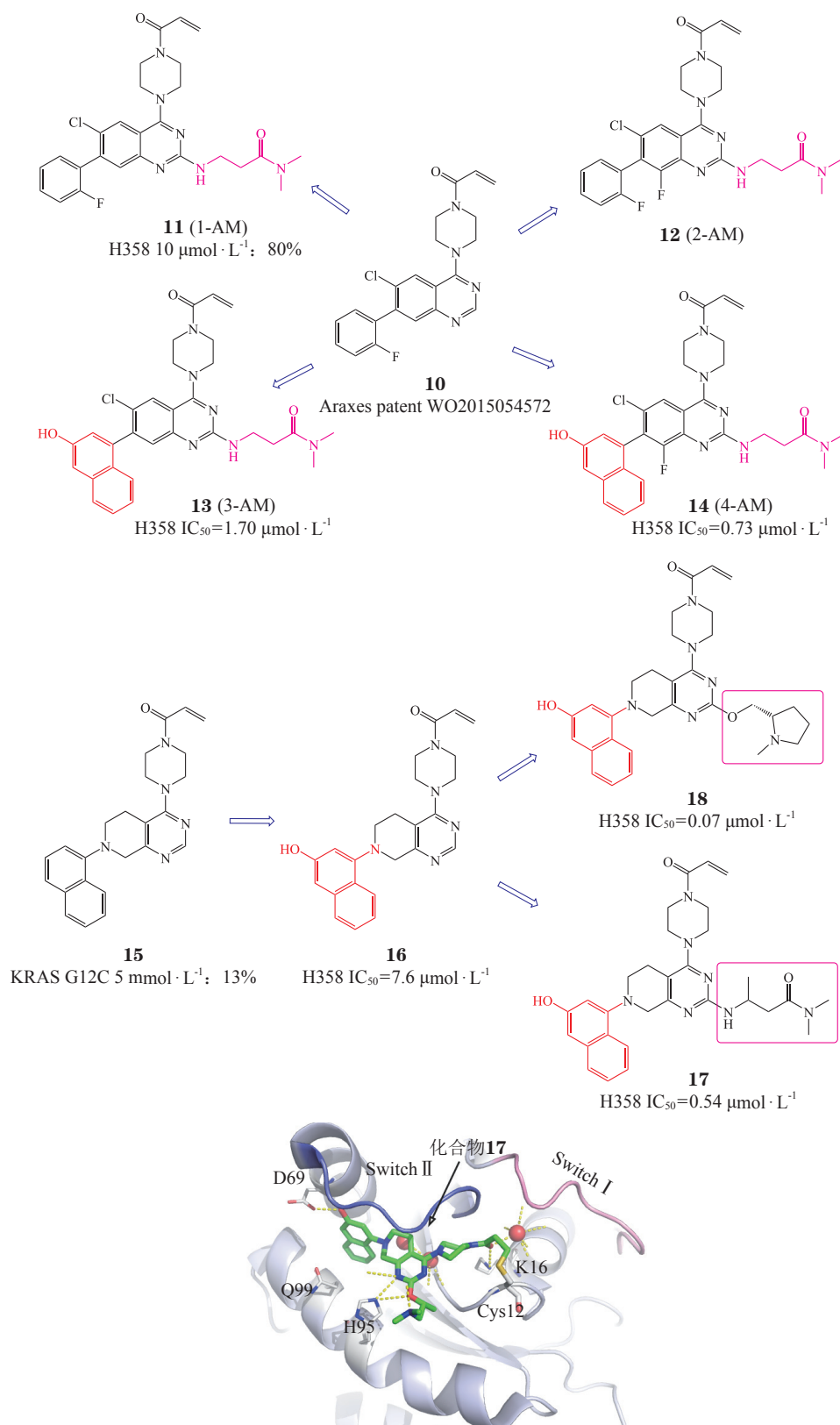


图7 化合物 17 与 KRAS G12C 的共晶结构 (PDB ID: 6N2K) [31]

Figure 7 X-ray co-crystal structure of compound 17 and KRAS G12C (PDB ID: 6N2K)

3.1.4 吡啶并嘧啶酮类 2018年 Lanman 等^[32]报道了吡啶并嘧啶酮类专利化合物(如化合物 **19**), 其对具有 *KRAS* 突变的前列腺癌细胞显示了优异的抑制活性 ($IC_{50}=0.211 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对其连接子区域以及疏水区结构优化得到了化合物 **20** 和 **21**, 二者细胞活性均有了显著的提高 (IC_{50} 值分别为 0.054 和 $0.012 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。安进公司基于此专利化合物合成了化合物 **22** (AMG510),

晶体结构表明, 化合物 **22** 能很好地占据连接子区域, 在疏水性区域能与周围氨基酸形成关键作用力, (见图 8)。目前已经公布了 AMG510 的临床 I 期试验结果^[33], 在入选的 34 名患者中, 大多表现出良好的缓解率, 且较少出现副作用^[34]。基于以上良好的临床结果, 安进公司将会继续推进 AMG510 单一疗法和组合疗法的发展计划。

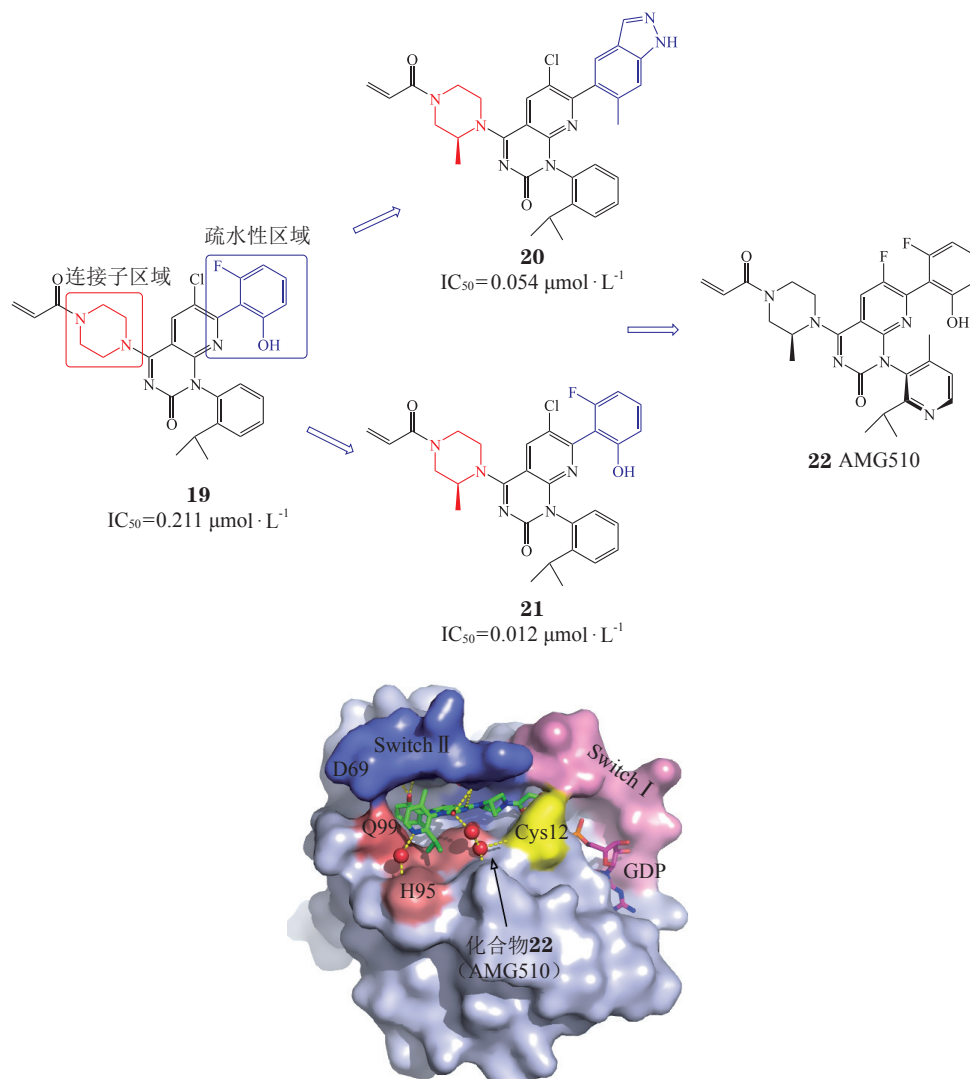
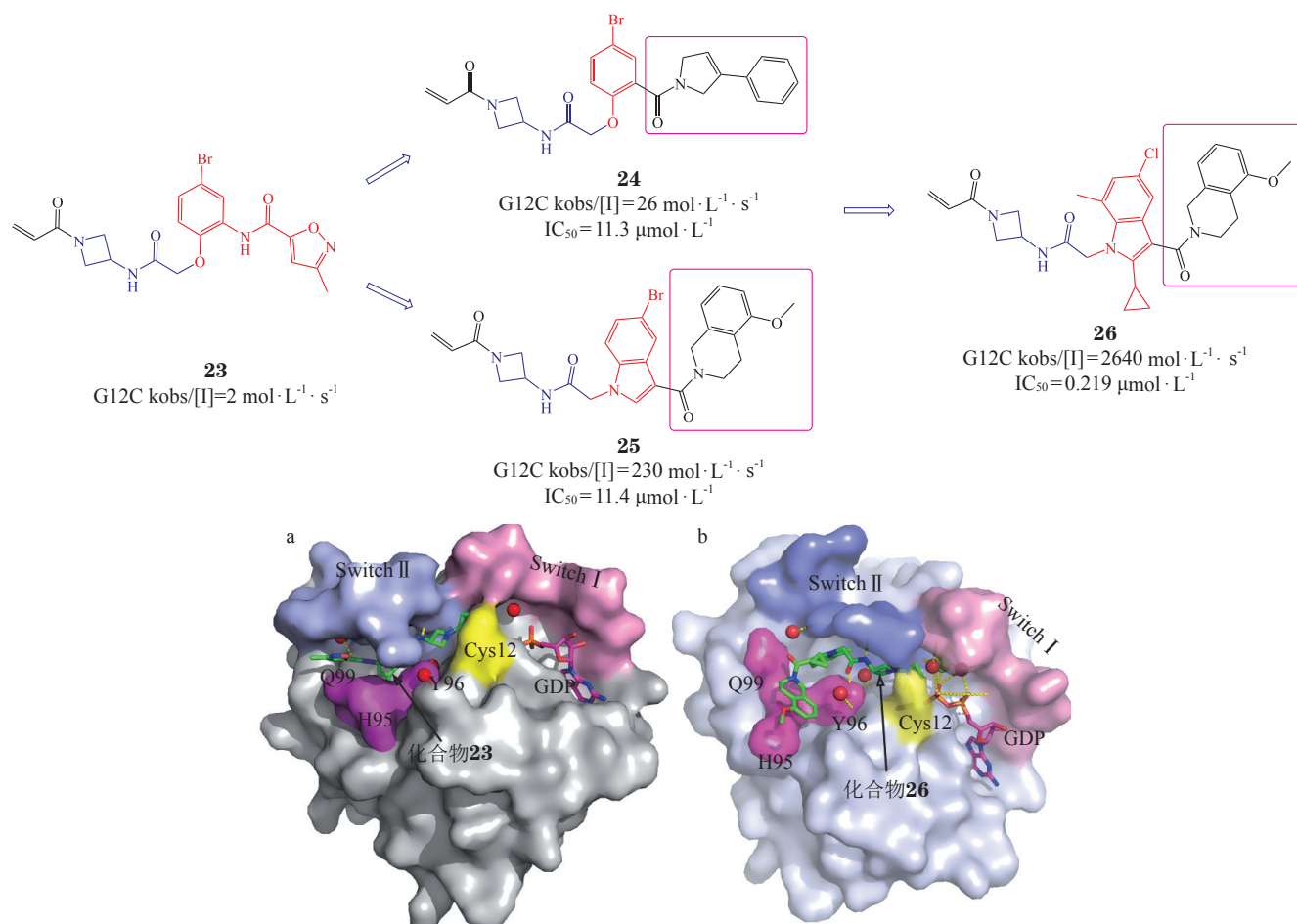


图 8 化合物 **22** 与 *KRAS* G12C 的共晶结构 (PDB ID: 6OIM)^[32]

Figure 8 X-ray co-crystal structure of compound **22** and *KRAS* G12C (PDB ID: 6OIM)

3.1.5 吡啶类 基于 ARS-1620 较好的体内疗效, Shin 等^[35]基于化学型进化技术筛选得到了化合物 **23**, 其对 *KRAS* G12C 的结合速率(表观速率常数 $k_{\text{obs}}\cdot[\text{I}]^{-1}$)为 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从化合物 **23** 与 *KRAS* G12C 的共晶发现, Switch II 处于闭合的状态, H95、Y96 和 Q99 形成了一个新的空腔, 但 **23** 并未占据此位点, (见图 9a)。进一步结构优化得到了苯环母核 **24** 和吡啶母核 **25** 两类, 其结合速率分别为

$26 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 $230 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 吡啶母核类 **25** 较化合物 **23** 活性有了 100 倍的提高。同时, 二者对胰腺癌细胞表现了一定的活性 (IC_{50} 分别为 11.3 和 $11.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。随后对吡啶母核类优化得到了 **26**, 其结合速率高达 $2640 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 细胞活性也有了极大的提高 ($IC_{50}=0.219 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。共晶结果显示, 四氢喹啉能很好的占据 H95、Y96 和 Q99 形成的空腔, 因此活性有了较大的提高, (见图 9b)。

图9 化合物**23**、**26**与KRAS G12C的共晶结构 (PDB ID: 6P8W、6P8Z) [36]Figure 9 X-ray co-crystal structure of compounds **23** & **26** and KRAS G12C (PDB ID: 6P8W、6P8Z)

3.2 催化位点抑制剂

催化位点抑制剂直接作用于鸟苷核苷酸底物位点, 这些抑制剂通过与核苷酸竞争活性位点, 破坏 GTP/GDP 与 KRAS 的结合, 从而使其处于非活性状态 [36]。长期以来, 直接针对 RAS 活性位点的小分子抑制剂的开发一直受到 KRAS 与底物亲和力强, 以及细胞中核苷酸浓度极高的阻碍。但是近期报道的成功共价激酶抑制剂 [37], 为解决 KRAS 竞争核苷酸位点的问题提供一种新的思路。

Lim 等 [38] 模拟 GDP 设计了第一个底物-竞争共价抑制剂化合物 **27**。在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GDP 或 GTP 条件下孵育 2 h, 化合物 **27** 与 KRAS G12C 结合率 >95%。氢交换质谱显示, 化合物 **27** 改变了核苷酸结合口袋的构象, 诱导其处于类似于与 GDP 结合的非活性形式, 从而影响 RAS 和 RAF 之间的蛋白-蛋白相互作用, 化合物 **27** 与 KRAS G12C 的共晶结构如图 10 所示。

由于化合物 **27** 是一种二磷酸盐化合物, 其磷酸酐

键易于水解, 因此化学性质不稳定, 膜穿透能力差。为了解决此问题合成了化合物 **28**, 化合物 **28** 的细胞通透性增强, 具有一定的抗癌细胞增殖活性, 同时 KRAS 依赖的 AKT 和 ERK 通路也被抑制。Xiong 等 [39] 对化合物 **27** 进行生物电子等排得到了化合物 **29**, 化合物 **29** 的化学稳定性有了很大的提高。尽管与化合物 **27** 相比其对 KRAS 的活性有所降低, 但化合物 **29** 仍然是一个非常具有前景的前药化合物。

4 组合法

近期的临床结果显示, 有些非小细胞肺癌患者已经出现了单药疗法的耐药性, 而 AMG510 对结直肠癌患者的部分缓解率只有不到 10% [40]。因此各大公司逐渐转向组合法, 主要有: 与程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 免疫抑制剂联用、与相关信号通路靶点抑制剂联用以及化疗药物联用。

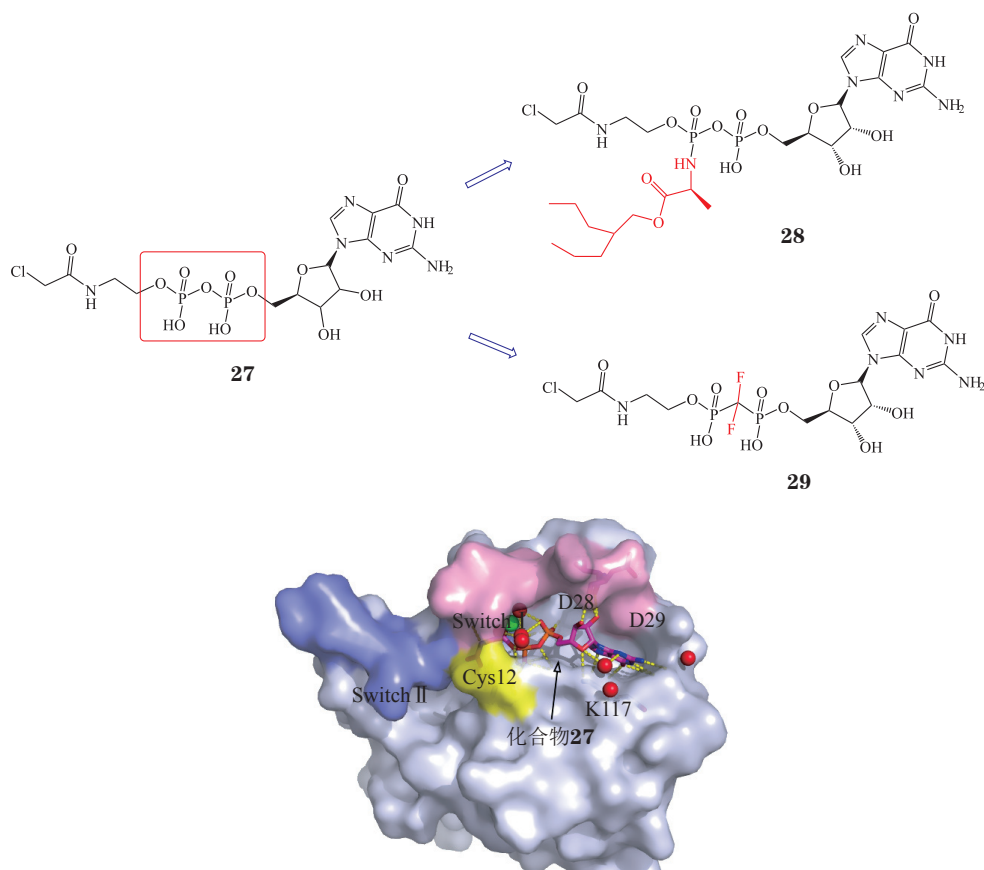


图 10 化合物 27 与 KRAS G12C 的共晶结构 (PDB ID: 4NMM) [39]

Figure 10 X-ray co-crystal structure of compound 27 and KRAS G12C (PDB ID: 4NMM)

4.1 与 PD-1 抑制剂联用

研究表明,携带 *KRAS G12C* 的非小细胞肺癌患者的 PD-1 表达水平较高,表明他们适合接受提高 T 细胞抗肿瘤活性的抗 PD-1 抑制剂的治疗 [41]。Baraibar 等 [42] 研究了在 *KRAS* 突变的肺癌患者中,阻断 PD-1 通路,增强 CD8/CD3 阳性 T 细胞肿瘤浸润,显示了肿瘤治疗的优异效果。

Mirati 公司指出 MRTX849 与 PD-1 抑制剂联用可能具有协同效应 [20]。安进公司的小鼠实验结果也表明 [43],单独使用 AMG510 时,在 10 只携带 *KRAS G12C* 突变肿瘤的小鼠中,仅一只小鼠的肿瘤完全消退,单独使用 PD-1 抑制剂的效果与此类似,但当联合用药时,10 只小鼠中有 9 只携带的肿瘤长时间完全消退,且未出现复发。验证了 *KRAS G12C* 抑制剂与 PD-1 抑制剂联用时,能够增强抗癌效果。

4.2 与相关信号通路靶点抑制剂联用

同时抑制同一信号通路的不同靶点,或者不同的信号通路均可增强抗癌疗效。基于这一策略,Christensen 等 [44] 研究了 MRATX1257 与相关信号通路靶点抑制

剂联用机制,为联合用药提供了思路。勃林格殷格翰公司近期将 BI-2852 与分裂原活化抑制剂 (MEK 抑制剂) 联用,用于治疗胃肠道和肺癌。安进公司为了验证 AMG510 是否也能与其他靶点产生协同效应,将 AMG510 联合其他靶点抑制剂进行了相关实验 [43]。结果表明,AMG510 与人表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂 (HER 激酶抑制剂)、含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂 (SHP2 抑制剂) 以及 MEK 抑制剂均具有较强的协同作用。Misale 等 [45] 将 *KRAS* 抑制剂与 PI3K 抑制剂联用也产生了较好的协同效果。Lu 等 [46] 也研究了 SHP2 抑制剂以及 MEK 抑制剂对 *KRAS* 突变肿瘤的作用。这些数据表明,与同一信号通路的不同靶点的抑制剂联用,可以从源头制约这一信号通路,同时可能消除旁路或者残余信号传导,有助于提高抗肿瘤效果以及防止耐药性的产生。

4.3 与化疗药物联用

安进公司的研究人员首次尝试了将 AMG510 与化疗药物卡铂联用 [43]。对荷有肿瘤的模型动物的研究表明,单独使用 AMG510 和卡铂时,均能显著缩小肿瘤

的体积, 但是当两者联用时, 肿瘤体积能更快更明显地缩小, 显著增强了抗肿瘤效果。这一结果为在临床试验中使用这一组合疗法提供了理论基础。

5 总结与展望

KRAS 作为癌症中最常突变的致癌基因, 由于其蛋白表面没有适合小分子抑制剂结合的口袋, 导致直接靶向 KRAS 的小分子药物开发在过去 30 多年里没有重大突破。近年来的研究发现, 在 KRAS G12C 突变体中, 存在着一个能够被共价抑制剂结合的变构位点。小分子

抑制剂通过与突变生成的半胱氨酸共价结合, 将 KRAS G12C 的构象锁定在失活状态, 从而抑制 KRAS G12C 突变体的活性。该发现使 KRAS G12C 这一“不可成药”靶点有了重大突破, 受到了业界的广泛关注。

目前已有多个 KRAS G12C 抑制剂处于临床阶段。但临床结果同时也表明, 有些患者已经出现单药疗法的耐药性。一些制药企业开始转向组合疗法的探索, 将 KRAS G12C 抑制剂与其他抑制剂联用显示出较强的抑制肿瘤效果以及不易产生耐药性的优势, 这对 KRAS G12C 抑制剂的临床试验推进具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Rojas A M, Fuentes G, Rausell A, *et al.* The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids[J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(2): 189-201.
- [2] Kessler D, Gmachl M, Mantoulidis A, *et al.* Drugging an undruggable pocket on KRAS[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(32): 15823-15829.
- [3] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 761-774.
- [4] Cagir A, Azmi A S. KRAS(G12C) inhibitors on the horizon[J]. *Fut Med Chem*, 2019, 11(9): 923-925.
- [5] Westover K D, Janne P A, Gray N S. Progress on covalent inhibition of KRAS(G12C)[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(3): 233-234.
- [6] Lu S Y, Jang H, Gu S, *et al.* Drugging Ras GTPase a comprehensive mechanistic and signaling structural view[J]. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(18): 4929-4952.
- [7] Li S, Jang H, Zhang J, *et al.* Raf-1 cysteine-rich domain increases the affinity of K-Ras/Raf at the membrane, promoting MAPK signaling[J]. *Structure*, 2018, 26(3): 513-525.
- [8] Papke B, Der C J. Drugging RAS: know the enemy[J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1158-1163.
- [9] Bhattacharya S, Socinski M A, Burns T F. KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2015, 4(1): 35[2019-12-11]. <https://link.springer.com/article/10.1186/s40169-015-0075-0>.
- [10] Che Y, Siprashvili Z, Kovalski J R, *et al.* KRAS regulation by small non-coding RNAs and SNARE proteins[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5118[2019-12-11]. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13106-4>. Doi: 10.1038/s41467-019-13106-4.
- [11] Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 871-879.
- [12] Lu S Y, Jang H, Nussinov R, *et al.* The Structural basis of oncogenic mutations G12, G13 and Q61 in Small GTPase K-Ras4B[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21949[2019-12-11]. <https://www.nature.com/articles/srep21949>. Doi: 10.1038/srep21949.
- [13] Peeters M, Kafatos G, Taylor A, *et al.* Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomised controlled trials[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(13): 1704-1713.
- [14] Nnadi C I, Jenkins M L, Gentile D R, *et al.* Novel K-Ras G12C switch-II covalent binders destabilize Ras and accelerate nucleotide exchange[J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(2): 464-471.
- [15] McCarthy M J, Pagba C V, Prakash P, *et al.* Discovery of high-affinity noncovalent allosteric KRAS inhibitors that disrupt effector binding[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(2): 2921-2930.
- [16] Lu S Y, Banerjee A, Jang H, *et al.* GTP binding and oncogenic mutations may attenuate hector binding site[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(48): 28887-28900.
- [17] Lu J, Harrison R A, Li L B, *et al.* KRAS G12C drug development: discrimination between switch II pocket configurations using hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry[J]. *Structure*, 2017, 25(9): 1442-1448.
- [18] Ostrem J M, Shokat K M. Direct small-molecule inhibitors of KRAS:

- from structural insights to mechanism-based design[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(11): 771-785.
- [19] Govindan R, Fakih M, Price T, *et al*. Phase 1 study of safety, tolerability, pk and efficacy of Amg 510, a novel Kras(G12c) inhibitor, evaluated in nsccl[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(10): S208-S210.
- [20] Papadopoulos K P, Ou S H I, Johnson L, *et al*. A phase I/II multiple expansion cohort trial of MRTX849 in patients with advanced solid tumors with *KRAS G12C* mutation[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15 suppl):TPS3161-TPS3161.
- [21] Hallenbeck K K, Turner D M, Renslo A R, *et al*. Targeting non-catalytic cysteine residues through structure-guided drug discovery[J]. *Curr. Top Med Chem*, 2017, 17(1): 4-15.
- [22] Hansen R, Peters U, Babbar A, *et al*. The reactivity-driven biochemical mechanism of covalent *KRAS(G12C)* inhibitors[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(6): 454-462.
- [23] Lito P, Solomon M, Hansen R, *et al*. Allele-specific inhibitors inactivate mutant *KRAS G12C* by a trapping mechanism[J]. *Science*, 2016, 351(6273): 604-608.
- [24] Ostrem J M, Peters U, Sos M L, *et al*. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions[J]. *Nature*, 2013, 503(7477): 548-551.
- [25] Patricelli M P, Janes M R, Li L S, *et al*. Selective Inhibition of oncogenic *KRAS* output with small molecules targeting the inactive state[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(3): 316-329.
- [26] Sautier B, Nising C F, Wortmann L. Latest advances towards RAS inhibition: a medicinal chemistry perspective[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(52): 15982-15988.
- [27] Blake J F, Burgess L E, Chicarelli M J, *et al*. KRas G12C inhibitors: WO, 2015/054572 [P]. 2018-11-13.
- [28] Wijeratne A, Xiao J P, Reutter C, *et al*. Chemical proteomic characterization of a covalent KrasG12c inhibitor[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9(6): 557-562.
- [29] Janes M R, Zhang J C, Li L S, *et al*. Targeting *KRAS* mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 578-589. e17.
- [30] Zeng M, Lu J, Li L B, *et al*. Potent and selective covalent quinazoline inhibitors of *KRAS G12C* [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(8): 1005-1016.e3.
- [31] Fell J B, Fischer J P, Baer B R, *et al*. Discovery of tetrahydropyridopyrimidines as irreversible covalent Inhibitors of *KRAS-G12C* with *in vivo* activity[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9(12): 1230-1234.
- [32] Lanman B A, Cee V J, Pickrell A J, *et al*. *KRAS G12C* inhibitors and methods of using the same: WO, 15/849,905[P]. 2018-6-28.
- [33] Fakih M, Oneil B, Price T J, *et al*. Phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and efficacy of AMG 510, a novel small molecule *KRAS(G12c)* inhibitor, in advanced solid tumors[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15): 3003[2019-12-11]. https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.3003.
- [34] Govindan R, Fakih M, Price T, *et al*. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of AMG 510, a novel *KRAS(G12C)* inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(11): S1125-S1126.
- [35] Shin Y, Jeong J W, Wurz R P, *et al*. Discovery of *N*-(1-acryloylazetidin-3-yl)-2-(1*H*-indol-1-yl)acetamides as covalent inhibitors of *KRAS(G12C)*[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10(9): 1302-1308.
- [36] Hunter J C, Gurbani D, Ficarro S B, *et al*. In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(24): 8895-8900.
- [37] Zhang T, Inesta-Vaquera F, Niepel M, *et al*. Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK[J]. *Chem Biol*, 2012, 19(1): 140-154.
- [38] Lim S M, Westover K D, Ficarro S B, *et al*. Therapeutic targeting of oncogenic K-Ras by a covalent catalytic site inhibitor[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(1): 199-204.
- [39] Xiong Y, Lu J, Hunter J, *et al*. Covalent guanosine mimetic inhibitors of G12C *KRAS*[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 8(1): 61-66.
- [40] Govindan R, Fakih M G, Price T J, *et al*. Phase I study of AMG 510, a novel molecule targeting *KRAS G12C* mutant solid tumours[J/OL]. *Ann Oncol*, 2019, 30: 163-164[2019-12-11]. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz244.008>.
- [41] Liu C, Zheng S, Jin R, *et al*. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in *KRAS*-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity[J/OL]. *Cancer lett*, 2020, 470: 95-105[2019-12-11].

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383519305245>.
Doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.027.
- [42] Baraibar I, Roamn M, Lopez-Eedozain I, *et al.* High sensitivity to PD-1 blockade therapy after Id1 depletion in KRAS-driven lung cancer through CD⁸⁺/CD³⁺ tumor infiltration and PD-L1 induction [J/OL]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(10): S320[2019-12-11]. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.645>.
- [43] Canon J, Rex K, Saiki A Y, *et al.* The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 217-223.
- [44] Christensen J G, Fell J B, Marx M A, *et al.* Abstract LB-271: insight towards therapeutic susceptibility of KRAS mutant cancers from MRTX1257, a novel KRAS G12C mutant selective small molecule inhibitor [J/OL]. *Cancer Res*, 2019, 79(13 suppl): LB-271[2019-12-11]. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-LB-271>.
- [45] Misale S, Fatherree J P, Cortez E, *et al.* KRAS G12C nscic models are sensitive to direct targeting of KRAS in combination with PI3K Inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(2): 796-807.
- [46] Lu H Y, Liu C, Velazquez R, *et al.* SHP2 inhibition overcomes RTK-mediated pathway reactivation in KRAS mutant tumors treated with MEK inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(7): 1323-1334.



【专家介绍】陆涛:教授,药物化学专业博士生导师,江苏省教学名师,中国药科大学副校长。现担任全国药专业学位研究生教育指导委员会副主任委员,国家基金委生命科学部通讯评议专家,教育部本科教学审核评估专家;江苏省学位委员会委员;江苏化学化工学会理事、有机化学专业委员会委员等学术职务。《药学进展》执行主编,《中国药科大学学报》编委。主要研究方向:新药分子设计与合成研究、计算机辅助药物设计、有机合成化学、药物生物统计与计算药理学。主持完成多项国家、省部级课题,目前课题组在研国家自然科学基金10项,自主知识产权的抗AML临床候选化合物,完成以FN-1501为代表的原创性科技成果转化。获得美国FDA“突破性药物”(Breakthrough)资格进入加速审批通道、临床试验许可和孤儿药资格认证。目前, FN-1501作为治疗AML的药物已被美国FDA、澳大利亚和中国NMPA批准进入I期临床研究,有望弥补国内AML治疗的药物空白,为合理用药和临床试验方案设计提供新的选择,推动医药行业的创新发展,产生明显的社会和经济效应。迄今已培养博士研究生16名,硕士研究生90名,共发表SCI论文100余篇,获得国内外授权专利9项,其中,2个代表性药物的研发历程和工艺研究发表在*J Med Chem*、*Angew Chem-Int Edit*、*Org Lett*等药物研究知名期刊,为小分子创新药物的研发提供重要的科技支撑。



【专家介绍】陈亚东:博士,教授,药物化学专业、药学信息学专业博士生导师。江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师(2008),江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人(2014)。美国密歇根大学(University of Michigan, Ann Arbor)医学院综合癌症中心访问学者。主持和参与了国家自然科学基金,国家重大科技专项“重大新药创制”等多项科研项目。申请国内专利14项,国际专利1项,授权3项;主编或参编学术著作和教材3本;在*J Med Chem*、*Eur J Med Chem*、*J Chem Inf Model J*等国际学术期刊发表SCI论文80多篇。2015年研究团队发现的1.1类抗肿瘤新药临床前候选化合物以1.5亿人民币转让给上海复星医药,目前在美国、澳大利亚及中国进行I期临床。