

## 特异靶向KRAS-G12C突变的抗肿瘤药物研究进展

李 歆<sup>1</sup>, 王义俊<sup>2</sup>, 刘平羽<sup>2\*</sup>

(1. 南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166; 2. 南京医科大学第二附属医院药学部, 江苏 南京 210011)

**摘要:** RAS是肿瘤中突变最为广泛的癌基因,但是至今尚无针对RAS突变肿瘤的靶向治疗药物获批在临床使用。近年来,针对KRAS-G12C突变体的抑制剂研发进展迅猛,被认为是当前针对RAS突变肿瘤最具希望的突破方向。本综述围绕KRAS-G12C突变,重点介绍了针对半胱氨酸的共价抑制剂研发进展、联合用药策略和基于蛋白降解的蛋白水解靶向嵌合体(PROTACs)技术的应用,总结了相关新药研发的最新进展。自2013年首个针对KRAS-G12C的共价抑制剂被报道以来,该领域已经取得了快速进展,目前进展较快的化合物已在临床取得显著疗效,极有希望在近期上市;PROTACs降解剂的研发虽然刚刚起步,新近也获得了显著进展,有望带来新的希望。针对RAS的抗肿瘤药物研发有望迎来首个突破,但也仍面临着诸多挑战,进一步优化技术、探明机制和明晰策略将是未来的努力方向。

**关键词:** KRAS突变肿瘤; KRAS-G12C突变体; 抗肿瘤药物; 共价抑制剂; 蛋白水解靶向嵌合体; 联合用药  
**中图分类号:** R979.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2021)02-0374-09

## Recent advancement in targeting the KRAS-G12C mutant for cancer therapy

LI Xin<sup>1</sup>, WANG Yi-jun<sup>2</sup>, LIU Ping-yu<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. Pharmacy Department, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China)

**Abstract:** RAS, as a well-known proto-oncogene, is the most frequently mutated oncogene in human cancers, yet tremendous efforts over the past 30 years have failed to develop effective therapies for RAS-mutant cancer. Recently, specifically targeting the KRAS-G12C mutant, a frequently occurring KRAS mutation in human cancers, has shown promise in conquering KRAS-mutant cancers, and has inspired interest in this direction. We herein review the very recent progress achieved in the development of covalent inhibitors towards KRAS-G12C mutant, in combinational therapies and in proteolysis-targeting chimeras (PROTACs)-based approaches to disrupt KRAS-G12C protein. We provide insights for drug discovery against KRAS-G12C-mutated tumors and discuss the potential challenges in this field.

**Key words:** KRAS mutated cancer; KRAS-G12C mutant; anticancer drug; covalent inhibitor; proteolysis-targeting chimeras; combination therapy

RAS蛋白属于具有GTPase酶活性的鸟嘌呤核苷结合蛋白,包括KRAS、HRAS和NRAS 3种亚型。RAS的活性因与二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)

或三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的结合转换而切换,与GDP结合时处于失活的状态,与GTP结合时则激活。在细胞中,RAS处于信号通路相对中枢位置,承接上游多种生长因子受体的信号,激活下游多条信号通路包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphati-

收稿日期: 2020-09-14; 修回日期: 2020-10-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(72074123).

\*通讯作者 Tel: 86-25-58509955, E-mail: 20953836@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1485

dylinositol 3-kinase, PI3K) 和鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子 (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator, RalGDS) 等, 调控基因转录和蛋白合成等过程, 进而影响细胞生长、分化、凋亡和转移等<sup>[1]</sup>。

RAS是肿瘤中突变最为广泛的癌基因, 大约30%的肿瘤中含有RAS突变。KRAS、HRAS和NRAS3种亚型均被发现在肿瘤中存在突变, 其中以KRAS突变最为常见, 占RAS突变的80%左右。KRAS突变在胰腺癌、非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和结直肠癌中最为常见, 特别是在胰腺癌中高达90%。KRAS突变主要发生在12、13位甘氨酸 (glycine, Gly, G) 和61位谷氨酰胺 (glutamine, Gln, Q) 3个位点。其中G12位突变发生率最高, 受到广泛关注<sup>[2]</sup>。

尽管KRAS突变在肿瘤中的重要作用已经得到了广泛共识, 但是针对KRAS突变体的抗肿瘤药物研究道路一直充满荆棘, 至今尚无靶向KRAS的药物获批上市。长期以来, KRAS突变体被认为是一个“难以靶向 (undruggable)”的靶点, 其原因与KRAS蛋白的作用特点直接相关: ① KRAS与GTP的亲合力极强, 可达到皮摩尔水平, 比蛋白激酶对ATP的亲合力强1000倍以上, 且细胞中GTP浓度很高, 因此很难像蛋白激酶抑制剂一样, 实现针对GTP结合位点的有效竞争; ② KRAS蛋白表面平滑, 具有近乎球形的空间结构, 缺乏较深的疏水口袋, 阻碍了高亲合力抑制剂的识别<sup>[3,4]</sup>。

过去30多年来, 针对KRAS突变肿瘤的药物研发的探索从未停止。靶向KRAS的药物发现策略, 主要有以下几种<sup>[5-9]</sup>: ① 影响KRAS功能相关的翻译后修饰或蛋白定位; ② 影响KRAS与其调节蛋白或下游蛋白的结合, 如调节蛋白SOS (son of sevenless) 和下游效应蛋白RAF; ③ 抑制KRAS下游关键信号通路; ④ 针对特定突变体的共价抑制思路; ⑤ 基于KRAS肿瘤的协同致死策略 (synthetic lethality) 等。上述策略均取得了不同程度的进展。例如, 通过与SOS1结合来阻断KRAS通路的首个泛KRAS抑制剂BI 1701963, 有望突破KRAS突变不同类型的限制, 广泛抑制KRAS突变肿瘤, 目前已经启动临床研究, 并将中国纳入了其全球早期临床开发项目; KRAS通路下游分子MEK (mitogen-activated protein kinase) 的抑制剂曲美替尼 (trametinib) 单用或联用治疗KRAS突变的NSCLC也在临床中初现疗效; 此外, 基于协同致死策略的Polo样激酶蛋白激酶1 (Polo-like kinase 1, PLK1) 抑制剂也已经进入临床研究, 探索对KRAS突变结直肠癌的治疗潜力。当前, 毋庸置疑, RAS领域最受关注的是特异针对KRAS-G12C的共价抑制策略, 被认为是最有可能在近期取得突破的KRAS抑制剂研发方

向, 掀起了KRAS抑制剂研究的新高潮<sup>[6,10-12]</sup>。本文将围绕这一热点领域, 就新近取得的进展进行总结, 并就面临的挑战进行讨论, 希望为针对KRAS-G12C突变的抗肿瘤新药研发提供系统的信息和新的思路。

## 1 KRAS-G12C突变与肿瘤

RAS蛋白包含4个结构域, 其中氨基酸1~166组成G结构域 (G-domain), 该结构域在各亚型中高度保守, 其余23~24个氨基酸组成高度可变区 (hyper-variable region, HVR)。G-domain包含了关键的核苷酸结合口袋, 由P-loop (氨基酸10~17)、Switch I (SWI, 氨基酸30~38) 和Switch II (SWII, 氨基酸60~67) 等区域组成。SWI和SWII区域对于RAS活性至关重要。当RAS处于GTP结合的活性状态时, GTP分子中的磷酸分别与SWI的35位苏氨酸和SWII的60位Gly形成氢键; GTP被水解时, SWI和SWII随即分开, 恢复非活性构象<sup>[2]</sup>。KRAS的G12位于KRAS蛋白SWI、SWII以及P-loop三方交界的区域。根据肿瘤中该位点氨基酸残基的变化情况, KRAS的12位Gly可能产生10余种不同形式的突变, 其中突变为天冬氨酸 (G12D)、缬氨酸 (G12V) 和半胱氨酸 (G12C) 的发生频率最高。KRAS-G12C突变特指KRAS的12位Gly突变为半胱氨酸 (cysteine, Cys, C), 该突变主要在胰腺癌中比例最高, 超过10%。

对于KRAS突变对其功能产生的影响, 主要基于生物化学和结构生物学的研究证据, 虽然以往已经有了大量的研究, 但是认识仍不明晰。一般认为, KRAS12、13和61位点突变均能降低GTPase酶活, 但是不同形式的KRAS突变体的激活机制并不尽相同, 例如G13D突变体的核苷酸交换速度要高于其他突变体<sup>[13]</sup>; G12位突变会影响GTP水解, 在所有的G12突变体中, G12C的GTPase的酶活水平最高。对于KRAS-G12C突变的导致KRAS异常激活的机制, 目前认识还比较有限。早期的认识主要依赖于对KRAS活性调控机制的理解和对KRAS-G12C结构生物学研究。如前所述, GTP水解为GDP是RAS活性转换的关键步骤, 而RAS高效水解GTP需要GAP蛋白参与。研究表明, GAP与RAS结合后, 会将其精氨酸残基伸到催化位点, 协助GTP水解, 被称作精氨酸手指 (arginine finger)。结构生物学研究提示, G12替换成脯氨酸之外的任何氨基酸, 其立体位阻将阻碍精氨酸手指进入催化位点。受到这一证据提示, 人们猜测G12C突变可能降低了KRAS的GTPase活性, 造成激活型KRAS-GTP比例增加。然而, 随着G12C抑制剂的发现, 为认识该突变的功能提供了新的手段, 带来了G12C功能的全新认识。人们发现, G12C自身的GTPase活性似乎并没有

下降。KRAS-G12C 类似于野生型, 也存在 GTP/GDP 循环。KRAS-G12C 是一种“过度激活 (hyperactive)”的状态<sup>[14,15]</sup>。

## 2 KRAS-G12C 共价抑制

近年来, 针对表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 和 Bruton's 酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 的 Cys 的共价抑制剂在临床相继取得成功, 为 KRAS-G12C 共价抑制剂的研究提供了新的思路, 使得这一突变形式从众多的 G12 突变体中脱颖而出, 成为 KRAS 突变体中可行性最高的靶点。从 2013 年第一个针对 KRAS-G12C 的抑制剂被报道至今, 短短几年时间, 该类抑制剂已经在临床研究中初见成效, 显示出极大的潜力, 有望近期上市, 为患者带来新的希望 (图 1)<sup>[12,16]</sup>。

### 2.1 针对 Cys 的共价抑制策略

一直以来, 由于对共价抑制剂的作用机制认识不足及其潜在毒性的担心, 使得非共价抑制剂成为药物研发的主流。目前发现的大多数药物, 都是通过其非共价作用实现对靶点功能的干预。近年来, 随着酶化学、酶动力学等方面认识的不断深入, 共价抑制剂的研发引起了人们的关注。特别是针对蛋白激酶共价抑制剂的成功上市, 推动了在更广阔的靶点领域探索共价抑制剂的治疗机会。共价抑制剂具有显著的优势: ① 靶点作用更强: 共价抑制剂大多通过不可逆的共价修饰实现对靶点的功能干预, 避免了可逆反应导致的靶点功能恢复, 因此作用更加持久, 药物有效浓度大幅度降低; ② 选择性更高: 共价抑制剂独特的结合口袋在选择性方面显示出独特的优势。以目前上市药物最多的 ATP 竞争性激酶抑制剂为例, 这类抑制剂大多结合于激酶靶点的 ATP 结合口袋, 因为该区域的氨基酸序列相对保守, 因此很难避免抑制剂对同家族激酶的抑制。共价抑制剂一般作用于非保守区域, 避开了保

守区域, 因此选择性更高<sup>[17]</sup>。

Cys 是最强的具有亲核作用的氨基酸, 其侧链富电子巯基极易与药物分子中的亲电基团反应形成共价键, 导致药物分子的不可逆结合而达到抑制蛋白功能的效果。不可逆共价抑制剂通常包含“导引头”与“反应弹头”两个部分, 分别实现不同功能。其中, 导引头识别靶蛋白上的结合口袋, 通过与口袋附近氨基酸残基的疏水作用等非共价作用与靶点结合, 确保了共价抑制剂的选择性; 随后, 反应弹头与 Cys 残基发生化学反应, 形成共价连接<sup>[18]</sup>。这一机制也解释了为何关键的 Cys 残基在蛋白中广泛存在, 但是共价抑制剂仍能保持较好的选择性。例如, 已经上市的 EGFR 三代抑制剂 AZD9291 的嘧啶环 C-2 位的亲电反应基团能与 ATP 结合位点的 Cys797 残基形成共价键结合<sup>[19-21]</sup>; BTK 不可逆共价抑制剂如 ibrutinib 的丙烯酰胺弹头的亲电子的烯键能与 BTK 的 Cys481 的巯基发生迈克尔加成反应形成共价键, 占用了 BTK 分子的活性口袋, 不可逆地抑制 BTK 的激酶活性<sup>[22]</sup>。

### 2.2 KRAS-G12C 共价抑制剂

Cys 共价抑制剂不断取得突破, KRAS-G12C 成为众多 KRAS 突变体中的理想靶点。一方面, 变异产生的 Cys 可以成为不可逆抑制剂进攻的目标, 减少了对结合口袋的依赖, 一定程度上克服了 RAS 蛋白表面缺乏结合口袋的问题; 另一方面, G12C 位于 SWI、SWII 以及 P-loop 三方交界的区域, 提示抑制 G12C 极有可能对 RAS 构象和活性产生重要影响。

2013 年, 美国加州大学 Shokat 团队<sup>[23]</sup>率先报道了首个针对 KRAS-G12C 的共价抑制剂。该抑制剂的发现得益于一种基于二硫键的小分子片段库筛选方法, 该方法利用了半胱氨酸侧链巯基的高反应性, 小分子的二硫键可以与靶蛋白 Cys 的巯基发生交换反应, 形成共价连接。该方法通过还原处理去除了其他缀合片段,

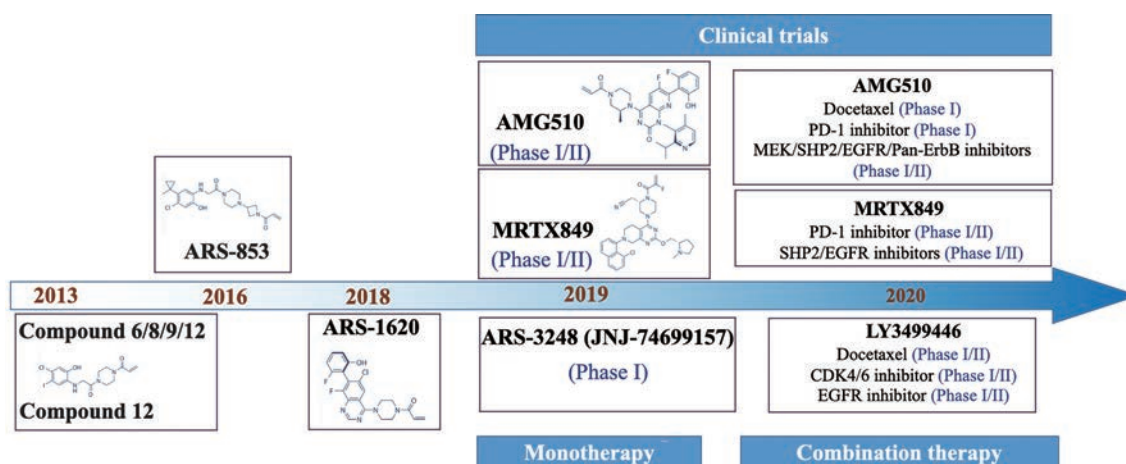


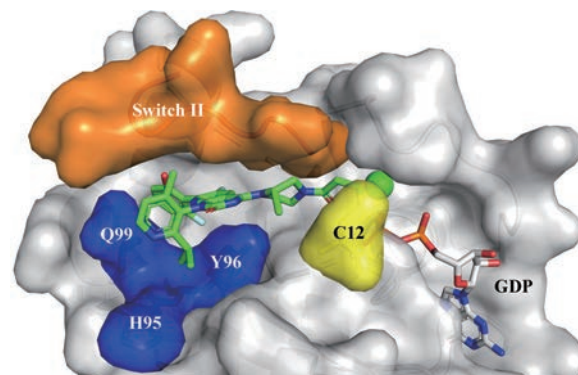
Figure 1 The timeline of the discovery and development of KRAS-G12C covalent inhibitors

使得真正进入 Cys 结合口袋内部的小分子片段得以保留, 并通过蛋白质谱法进行检测。上述筛选得到的活性片段, 结合药物化学的构效关系研究, 得到了活性化合物 **6**。在此基础上, 研究者进一步摒弃了化合物的二硫键活性中心, 引入共价抑制剂常用的丙烯酰胺类改造策略, 得到了化合物 **12**, 活性较化合物 **6** 显著提升。这些化合物能够阻断 SOS 介导的核苷酸交换, 导致突变 KRAS 对 GDP 的亲合力增加, 显示出对 KRAS-G12C 的显著抑制活性。对活性化合物和 RAS 蛋白的复合物晶体的结构研究, 极大地推动了对其作用机制的认识, 并为该类抑制剂的研发提供了重要的理论指导。特别值得注意的是, 在化合物结合的 KRAS-GDP 的 SWII 区域下形成的一个新的结合口袋, 被称为 SWII 口袋 (switch II pocket, S-IIP), 而这一口袋在以往已经发表的 RAS 结构中并不明显, 这一发现很大程度上支持了针对 KRAS-G12C 共价抑制的可行性。

上述成果迈出了重要的第一步, 但是获得的化合物在 KRAS-G12C 肿瘤细胞内的抑制活性似乎并不明显。Wellspring 生物公司针对前期发现的变构口袋 S-IIP, 设计了对该口袋作用更强的抑制剂, 发现了化合物 ARS-853, 对细胞中的 KRAS-G12C 具有显著抑制作用, 实现了细胞活性的突破<sup>[24]</sup>。然而, 上述化合物的成药性均存在问题, 未能在体内表现出抗肿瘤活性。上述工作促成了 Wellspring 公司的进一步努力, 得到了活性和选择性更高的化合物 ARS-1620, 是首个在体内动物模型中被证实对 G12C 突变有抗肿瘤作用的共价抑制剂<sup>[25]</sup>。通过解析 ARS-1620 与 KRAS 蛋白的共晶结构, 研究人员确证了该化合物的作用模式与前期发现的化合物基本一致, 即抑制剂的结合诱导了变构口袋 S-IIP, 导致 RAS 与 GDP 的亲合力增加, 同时抑制了鸟苷酸交换因子 (GMP exchange factor, GEF) 催化的核苷酸交换, 通过上述机制, 将 RAS 锁在了非活性状态。ARS-1620 在小鼠体内表现出极好的口服生物利用度和代谢稳定性, 在 KRAS-G12C 突变的裸小鼠移植瘤模型中显示出抗肿瘤活性。2019年7月, Wellspring 公司与 Janssen 合作将 ARS-3248 (JNJ-74699157) 推进至临床研究。

同期, 美国安进 (Amgen) 公司也开展了针对 KRAS-G12C 的共价抑制剂开发。通过早期筛选得到了活性化合物 **1**<sup>[26]</sup>, 其与 GDP-KRAS 的共晶结构揭示, 该类化合物显示出与 ARS-1620 不完全相同的结合模式; 化合物 **1** 的四氢异喹啉环占据了一个 H95/Y96/Q99 组成的隐藏口袋, 这使得药物活性成倍提高。对化合物 **1** 和 ARS-1620 的结合模式的叠加发现, 取代 ARS-1620 的喹唑啉酮氮可能提供一种进入 H95 隐袋

的替代手段, 从而产生新的、增强效力的 KRAS-G12C 抑制剂。基于上述认识, 通过系统的构效关系研究结合成药性的考量, 成功研发出了靶向 KRAS-G12C 的共价抑制剂 (R)-38。与 KRAS-G12C 的共结晶揭示, (R)-38 的喹唑啉酮核心占据了 SWII 口袋, 丙烯酰胺部分与 C12 形成了共价键, 吡啶环的异丙基与 Y96、H95 和 Q99 紧密接触, 很大程度上填满了 H95 残基的侧链旋转所揭示的隐蔽口袋, 使得药物活性大大提高 (图 2)。(R)-38 在细胞水平抑制 KRAS 下游 ERK 磷酸化的半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 为  $68 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 口服生物利用度为 22%~40%; 在 KRAS-G12C 突变的 MIAPaca-2 异种移植模型中, 口服  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (R)-38 后肿瘤生长抑制率达 86%。(R)-38 显示出作为候选药物的开发潜力, 定名为 AMG510, 后来公布的通用名为 sotorasib。



**Figure 2** Sotorasib (AMG510) binding to KRAS-G12C protein. Orange: Switch II domain; Yellow: C12 residual; Blue: A cryptic pocket composed of H95, Y96 and Q99. AMG510 (green) and GDP (gray) are shown in sticks

美国 Mirati 公司利用基于结构的药物设计策略, 开发了 KRAS-G12C 选择性抑制剂 adagrasib (MRTX849)<sup>[27]</sup>。Adagrasib 能结合并稳定非活性状态的 KRAS-GDP。抑制 GTPase 活性或者影响 KRAS-G12C 的核苷酸交换功能, 均能影响化合物的活性, 提示通过影响核苷酸循环抑制了 KRAS-G12C 的活性。Adagrasib 能够对肿瘤细胞内的 KRAS-G12C 形成共价修饰, 并显著抑制 KRAS 下游 MAPK 信号通路, 对携带 KRAS-G12C 突变肿瘤细胞的  $IC_{50}$  介于  $10\sim 973 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间。研究者在 26 个不同组织来源的肿瘤细胞系移植瘤 (cell line derived xenograft, CDX) 或患者组织移植瘤 (patient derived xenograft, PDX) 模型中, 系统研究了 adagrasib 的体内抗肿瘤活性。在 23 个含有 KRAS-G12C 突变的移植瘤模型中, 17 个模型呈现出显著的治疗效果, 与对照组相比, 肿瘤缩小体积超过 30%; 而

3个不含G12C突变的模型则完全无效,提示了该化合物的良好活性和选择性。

另外一种较早尝试的策略是设计亲电子的GDP类似物,与核苷酸竞争KRAS的结合<sup>[28]</sup>。竞争性抑制是小分子抑制剂研发的重要思路。如前所述,由于KRAS对于GTP和GDP的亲合力都非常高,且细胞内GDP和GTP浓度都非常高,竞争抑制的策略被认为无法在RAS靶点上取得突破。观察到G12C突变位点位于GTP的磷酸基团附近,研究者提出是否可以套用ATP竞争性激酶共价抑制的策略<sup>[29]</sup>,通过共价结合G12C克服GTP/GDP的高亲和力带来的挑战,从而有效地占据RAS的GTP/GDP结合位点。这一策略产生了SML-8-73-1系列的化合物,可以与毫摩尔浓度的GTP/GDP竞争,使RAS处于一种失活状态<sup>[30]</sup>。

### 2.3 临床研究进展

Sotorasib于2018年8月率先启动临床I期试验,是首个进入临床研究的KRAS-G12C抑制剂<sup>[31,32]</sup>。继2019年在美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)、世界肺癌大会(World Conference on Lung Cancer, WCLC)和欧洲肿瘤内科学会(European Society for Medical Oncology, ESMO)上先后披露数据后,2020年9月24日,新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine, NEJM)发表了sotorasib的临床I期研究数据<sup>[33]</sup>。该研究包括剂量爬坡和剂量拓展两个阶段,剂量爬坡设置180、360、720和960 mg剂量组(口服给药,每日1次),共入组129例含KRAS-G12C突变的实体瘤患者(59例NSCLC、42例结直肠癌和28例其他实体瘤)。11.6%的患者发生了治疗相关的3~4级毒性反应,常见毒性为腹泻、疲劳和恶心,未见限制性毒性(dose limiting toxicity, DLT)或者治疗相关的患者死亡。在59例NSCLC中,19例为部分缓解(partial response, PR),33例为疾病稳定(stable disease, SD),客观响应率(objective response rate, ORR)为32.2%,疾病控制率(disease control rate, DCR)达到88.1%,中位无进展生存(median progression free survival, PFS)为6.3个月;在42例结直肠癌患者中,ORR为7.1%,DCR为73.8%,中位PFS为4.0个月。总体而言,NSCLC的疗效要显著优于结直肠癌。此前,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经授予sotorasib治疗KRAS-G12C突变型转移性NSCLC的快速通道认定。2020年3月9日,中国国家药品监督管理局(National Medicinal Products Administration, NMPA)也受理了sotorasib在中国开展临床研究的申请。经过30年努力,KRAS-G12C抑制剂第一次接近成功。

Adagrasib目前处于临床I/II期研究,是另一个备受关注的KRAS-G12C抑制剂。2019年10月,研究者首次公布了adagrasib的I期临床研究的初步结果,包括12例可供评估治疗患者(6例NSCLC、4例结直肠癌和2例阑尾癌)的治疗效果,其中NSCLC的获益最为显著,引起了人们的极大关注。2020年10月25日,在第32届国际分子靶标与癌症治疗学研讨会(EORTC-NCI-AACR)会议上,Mirati公司进一步公布了adagrasib的临床研究数据,包括上市注册的II期临床试验数据。综合临床I、II期数据,共有51例既往接受过含铂化或程序性死亡受体-1(programmed cell death protein-1, PD-1)或程序性死亡受体-配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)免疫治疗的KRAS-G12C突变NSCLC患者接受了adagrasib单药治疗(600 mg、每日2次)。疗效分析显示,45%(23/51)的患者为PR,51%(26/51)的患者为SD,ORR达到45%,DCR为96%。在PR患者中,70%(16/23)患者的肿瘤体积与基线相比缩小40%以上。基于上述结果呈现出来的显著临床获益,Mirati公司表示将于2021年下半年向FDA递交新药申请(new drug application, NDA),用于经过既往治疗的KRAS-G12C突变的NSCLC患者。

此外,截至2020年10月,Janssen公司与Wellspring合作开发的JNJ-74699157(ARS-3248)和Eli Lilly公司开发的LY3499446也相继进入临床研究,但是目前均无研究数据披露。

### 2.4 联合用药策略

在临床概念验证(proof-of-concept)的单药治疗研究大力推进的同时,这类抑制剂联合用药的研究也全面开展。目前,sotorasib、adagrasib和LY3499446都在临床进行联合用药研究。除了与一线治疗的化疗药物联合使用外,联合用策略主要涉及两个方面<sup>[16]</sup>。

#### 2.4.1 与上下游或相关通路抑制剂联用

该策略主要是基于更好地抑制KRAS通路或者防止其反馈激活的思路。例如KRAS-G12C抑制剂与MEK抑制剂、SOS1抑制剂、蛋白酪氨酸磷酸酶2(Src homology 2 domain-containing phosphatase, SHP2)抑制剂、EGFR抑制剂联用,都是基于上述思考。其中与SHP2的联合用药是新近较受关注的联合用药策略。SHP2是由PTPN11基因编码的细胞质蛋白酪氨酸磷酸酶,SHP2的活性对于RAS通路的激活是必需的,成为新近备受关注的抗肿瘤靶点<sup>[34]</sup>。此前有临床前研究证实,联合抑制SHP2和MEK能显著抑制KRAS突变肿瘤的生长<sup>[34,35]</sup>,新近SHP2抑制剂与KRAS-G12C抑制剂的联用也显示出优势<sup>[36]</sup>。同时,SHP2抑制剂的研发也相继取得突破,诺华等公司研制的SHP2变构抑制剂TNO155、

RMC-4630 以及国内加思科公司研制的 JAB-3068 和 JAB-3312, 相继进入临床研究, 为临床联合用药探索铺平了道路<sup>[37,38]</sup>。当前, KRAS-G12C 抑制剂 sotorasib、adagrasib 均选择了和 SHP2 抑制剂联用的策略。第 32 届 EORTC-NCI-AACR 上最新披露的临床数据报道, 1 例经过化疗、免疫治疗等多线治疗的 NSCLC 患者, 接受 adagrasib 与 TNO155 联用治疗后, 肿瘤体积缩小了 60%。

此外, sotorasib 与 adagrasib 的临床研究中都呈现出相似的趋势, 即对 NSCLC 的治疗效果要优于结直肠癌。目前针对这一现象已经有了相关的研究, 提示结直肠癌中本底高表达的受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 可能是结直肠癌疗效较弱的原因。结直肠癌的 EGFR 被证实参与了对 KRAS-G12C 抑制剂耐药<sup>[39]</sup>, 多个 RTK 可能同时介导了 KRAS 通路的反馈激活<sup>[40]</sup>。据此, 联合 EGFR 抑制剂治疗 KRAS-G12C 突变的结直肠癌患者也是当前临床探索的重要方向。

**2.4.2 与免疫治疗联用** 新近有研究发现, sotorasib 除了能直接抑制 KRAS-G12C 突变的肿瘤生长外, 还能提升肿瘤微环境中的免疫反应。在免疫健全的动物模型中, sotorasib 的治疗效果更加持久, 而在免疫缺陷小鼠中, 短时间响应以后会伴随肿瘤的反弹。Sotorasib 与免疫检查点抑制剂联用显示出持久的治疗效果<sup>[41]</sup>。与上述认识一致, adagrasib 作用于免疫健全的 CT-26 小鼠模型, 能促进抗原递呈, 重塑肿瘤免疫微环境<sup>[42]</sup>。据此, 与 PD-1 抑制剂联用也是临床大力探索的重要方向。根据新近披露的研究计划, adagrasib 也在探索与 PD-1 抑制剂联用治疗 NSCLC 患者。

### 3 靶向 KRAS-G12C 的 PROTACs 策略

近年来, 蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTACs) 技术的兴起, 使众多所谓的“难以靶向”靶点的药物研发成为可能, 成为新药研发领域备受关注的方向。针对 KRAS-G12C 的 PROTACs 也在新近取得了初步的进展。

#### 3.1 PROTACs 策略

PROTACs 是一种利用蛋白降解机制的新药研发策略<sup>[43,44]</sup>。PROTACs 降解剂实际上是一种双功能分子, 形状类似哑铃, 一端带有能与靶蛋白结合的小分子, 另一端是能招募 E3 泛素连接酶结合的小分子, 中间由连接器 (linker) 连接。PROTACs 技术利用细胞中经典的泛素-蛋白酶体途径, 实现对靶蛋白的降解作用 (图 3)。PROTACs 技术最大的优势之一, 是对于一些传统认为“难以靶向”靶点的药物研发, 带来了新的可能性。大多数小分子药物或单抗需要结合酶或受体的活性位点来发挥作用, 然而, 据估计, 人类细胞中 80% 的蛋白缺乏这样的位点, 对于这类靶点, PROTACs 比传统的

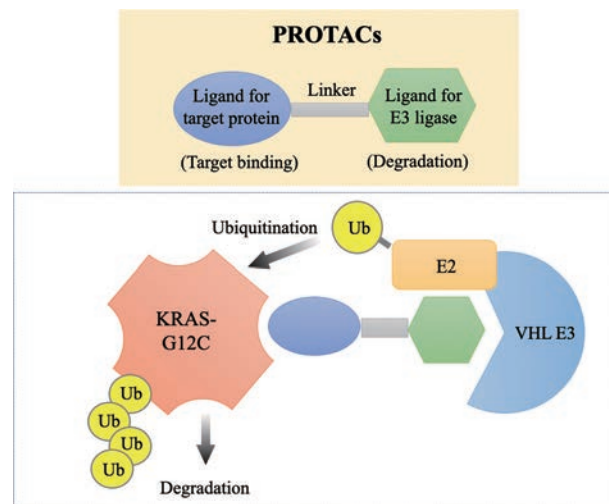


Figure 3 Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs)-based degradation of KRAS-G12C

小分子、抗体甚至抗体偶联药物具有显著优势。

事实上, 基于蛋白降解的技术药物研发思路早在上世纪末就被广泛尝试, 只是早期主要是基于肽类结构片段, 因为细胞膜通透性等问题, 极大地阻碍了其在药物研发中的应用。2008年, PROTACs 技术先驱 Craig M. Crews<sup>[45]</sup>由基于肽类结构转向给予小分子的 PROTACs 技术, 设计合成了基于 E3 泛素连接酶 MDM2 的小分子降解剂, 用于降解雄激素受体 (androgen receptor, AR)。2012年, 该团队又报道了基于泛素连接酶 VHL (Von Hippel-Lindau tumor suppressor) 的小分子 PROTACs, 真正将这一技术带到了新药研发的前沿<sup>[46]</sup>。近年来, 针对多个靶点的 PROTACs 降解剂被陆续报道, 该领域成为药物研发的热点领域。ARV-110 是全球首个进入临床试验的蛋白降解剂, 于 2019 年进入临床研究, 靶向 AR 治疗前列腺癌。

#### 3.2 靶向 KRAS-G12C 的 PROTACs

PROTACs 技术兴起之初, 开发靶向 KRAS-G12C 的降解剂就引起了人们的关注。早期靶向 KRAS-G12C 的 PROTACs 的设计思路是将靶向 KRAS-G12C 的“弹头”通过 linker 与作为 E3 泛素连接酶 CRBN 配体的泊马度胺类似物进行连接。然而, 早期研究中得到的 PROTACs 仅能对外源性的 KRAS-G12C 有效, 似乎对于内源性的 KRAS-G12C 并无显著的降解作用<sup>[47]</sup>。

近期 Craig M. Crews 团队<sup>[48]</sup>首次报道了针对内源性 KRAS-G12C 的降解剂 LC-2。LC-2 是采用 adagrasib 作为“弹头”, 与常用的 E3 连接酶 VHL 的配体连接得到 PROTACs 分子。最早发现的化合物 LC-1 仅能结合 KRAS-G12C, 但不能有效降解该蛋白。进一步的研究显示, 更短的连接剂能够更有效地降解 KRAS-G12C。

LC-2可持久地降解肿瘤中的KRAS-G12C,并有效抑制下游MAPK信号通路。此外,LC-2还体现出了较好的选择性,在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时,也未显示能够结合和降解KRAS-G13D,表明PROTACs是针对KRAS-G12C突变的可行策略。

#### 4 展望

历经30多年的不懈努力,人们第一次距离攻克KRAS突变肿瘤如此接近。然而,面临的挑战也显而易见:① G12C突变只占KRAS突变的一部分,且主要在肺癌中,对于其他常见突变KRAS-G12D和KRAS-G12V,因为这些突变体在活性部位缺乏活性Cys,目前大多尚无有效的策略。值得注意的是,美国Mirati公司最新报道了针对KRAS-G12D的选择性抑制剂MRTX1133,在临床前模型中体现出较好的治疗效果,刚刚披露就引起了领域的极大关注;② 针对G12C的选择性至关重要。目前报道的化合物大多较大剂量才能起效,这也增加了脱靶的风险,对药物的安全性提出较高的要求;③ 考虑到肿瘤的异质性,可以预见不同肿瘤对于药物的响应差异将很大。前期有数据提示,KRAS变异在肺腺癌和胰腺癌肿瘤内部异质性较小,而在肺鳞癌和肠癌中KRAS变异出现较晚,含有KRAS突变的肿瘤细胞可能只是其中的一个“亚克隆”。这预示RAS变异对药物的敏感度可能与肿瘤类型高度有关,这一猜测在sotorasib和adagrasib的临床数据中也得到证实。

此外,分子靶向药物出现耐药几乎是难以避免的,KRAS-G12C抑制剂的获得性耐药发生也是可以预见的。特别是,目前的抑制剂都是共价结合于GDP-RAS,上游RTK通过激活GTP-RAS,就可能治疗导致治疗效果减弱<sup>[49]</sup>。多个KRAS-G12C抑制剂的研究均提示,在大多数KRAS突变的肿瘤模型中,抑制KRAS-G12C都能引起RTK介导的RAS通路的反馈激活,且多个RTK都能参与这一作用<sup>[27]</sup>。最近的一项基于单细胞测序的研究进一步发现,KRAS-G12C抑制剂作用于KRAS-G12C突变的肺癌细胞,引起的效应具有显著的异质性。部分处于静息状态的细胞能新合成KRAS-G12C蛋白,这些细胞主要依赖EGFR和SHP2信号维持RAS信号通路,导致对药物的耐受。该研究还通过基于CRISPR-Cas9技术的全基因筛选发现了耐药细胞对Aurora A激酶的依赖性<sup>[50]</sup>。基于上述认识,联合抑制SHP2或者RTK都有可能克服KRAS抑制剂耐药。如前所述,SHP2抑制剂因为能够广泛阻断RAS信号通路的反馈激活,引起了更多的关注<sup>[40]</sup>。当然,目前临床应用时间还相对较短,上述发现都有待临床的进一步证实。

PROTACs策略引起了极大的关注,当前在多类抗肿瘤靶点被广泛尝试,有望带来新的突破。同时,该领域也面临着诸多挑战。首先,PROTACs分子由linker连接了两个分子片段,所以一般分子量较大,超过1 000 Da,成药困难。仍有待该领域的技术升级,以克服体内生物利用度和给药方式等各方面的成药性问题。第二,目前报道的PROTACs分子,对于E3泛素连接酶配体的应用还趋于一致,局限在几个常见的分子上,还有待进一步的拓展。第三,对于PROTACs的评价体系与传统意义上的小分子也有差别,还有待逐步完善,包括脱靶降解的发现、安全性评价体系、药效研究和剂量选择等。第四,目前的研究呈现出“过热”的端倪,到底哪些靶点最适合PROTACs技术需要明晰的策略和生物学机制的支持。

**作者贡献:** 李歆负责撰写、文献资料的收集和作图;刘平羽是综述框架的构思者及负责人,指导论文写作并对论文进行了详细修改和检查;王义俊进行了指导和帮助;全体作者都阅读并同意最终的文本。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### References

- [1] Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170: 17-33.
- [2] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 761-774.
- [3] Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, et al. Drugging the undruggable RAS: mission possible? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 828-851.
- [4] Papke B, Der CJ. Drugging RAS: know the enemy [J]. *Science*, 2017, 355: 1158-1163.
- [5] Ostrem JM, Shokat KM. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 771-785.
- [6] Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 871-879.
- [7] Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, et al. Dragging ras back in the ring [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25: 272-281.
- [8] Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 541-555.
- [9] Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, et al. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 533-552.
- [10] Cagir A, Azmi AS. KRAS (G12C) inhibitors on the horizon [J]. *Future Med Chem*, 2019, 11: 923-925.

- [11] Westover KD, Janne PA, Gray NS. Progress on covalent inhibition of KRAS (G12C) [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6: 233-234.
- [12] Nagasaka M, Li Y, Sukari A, et al. KRAS G12C game of thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne? [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 84: 101974.
- [13] Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, et al. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13: 1325-1335.
- [14] Lito P, Solomon M, Li LS, et al. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism [J]. *Science*, 2016, 351: 604-608.
- [15] 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: 454-462.
- [16] McCormick F. Sticking it to KRAS: covalent inhibitors enter the clinic [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37: 3-4.
- [17] Visscher M, Arkin MR, Dansen TB. Covalent targeting of acquired cysteines in cancer [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 30: 61-67.
- [18] Gehringer M, Laufer SA. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 5673-5724.
- [19] Ward RA, Anderton MJ, Ashton S, et al. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 7025-7048.
- [20] Zhou W, Ercan D, Chen L, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M [J]. *Nature*, 2009, 462: 1070-1074.
- [21] Walter AO, Sjin RT, Haringsma HJ, et al. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3: 1404-1415.
- [22] Patel V, Balakrishnan K, Bibikova E, et al. Comparison of acalabrutinib, a selective bruton tyrosine kinase inhibitor, with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 3734-3743.
- [23] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503: 548-551.
- [24] Patricelli MP, Janes MR, Li LS, et al. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6: 316-329.
- [25] Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor [J]. *Cell*, 2018, 172: 578-589.
- [26] Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRAS (G12C) (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 52-65.
- [27] Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, et al. The KRAS (G12C) inhibitor MRTX849 provides insight toward therapeutic susceptibility of KRAS-mutant cancers in mouse models and patients [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10: 54-71.
- [28] Lim SM, Westover KD, Ficarro SB, et al. Therapeutic targeting of oncogenic K-Ras by a covalent catalytic site inhibitor [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53: 199-204.
- [29] Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 28-39.
- [30] Hunter JC, Gurbani D, Ficarro SB, 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 U S A*, 2014, 111: 8895-8900.
- [31] Caruso C. AMG 510 first to inhibit "undruggable" KRAS [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9: 988-989.
- [32] Fakih M, O'neil B, Price TJ, et al. Phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and efficacy of AMG 510, a novel small molecule KRASG12C inhibitor, in advanced solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.3003.
- [33] Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRAS (G12C) inhibition with sotorasib in advanced solid tumors [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1207-1217.
- [34] Ruess DA, Heynen GJ, Ciecieski KJ, et al. Mutant KRAS-driven cancers depend on PTPN11/SHP2 phosphatase [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 954-960.
- [35] Mainardi S, Mulero-Sanchez A, Prahallad A, et al. SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 961-967.
- [36] Hao HX, Liu C, Lu H, et al. Combinations with allosteric SHP2 inhibitor TNO155 to block receptor tyrosine kinase signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2020. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2718.
- [37] Liu Q, Qu J, Zhao M, et al. Targeting SHP2 as a promising strategy for cancer immunotherapy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104595.
- [38] Lamarche ML, Acker M, Argintaru A, et al. Identification of TNO155, an allosteric SHP2 inhibitor for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2020. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01170.
- [39] Amodio V, Yaeger R, Arcella P, et al. EGFR blockade reverts resistance to KRAS G12C inhibition in colorectal cancer [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10: 1129-1139.
- [40] Ryan MB, Cruz FFDL, Phat S, et al. Vertical pathway inhibition overcomes adaptive feedback resistance to KRAS (G12C) inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 1633-1643.
- [41] Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS (G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2019, 575: 217-223.
- [42] Briere DM, Calinisan A, Aranda R, et al. The KRASG12C inhibitor MRTX849 reconditions the tumor immune microenvironment and leads to durable complete responses in combination with anti-PD-1 therapy in a syngeneic mouse model [C]/Pro-

- ceedings of the AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Boston, MA. Philadelphia: AACR, 2019: abstract nr LB-C09.
- [43] Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery [J]. *Cell*, 2020, 181: 102-114.
- [44] Ottis P, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras: induced protein degradation as a therapeutic strategy [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 892-898.
- [45] Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 5904-5908.
- [46] Buckley DL, Gustafson JL, Van Molle I, et al. Small-molecule inhibitors of the interaction between the E3 ligase VHL and HIF1alpha [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 11463-11467.
- [47] Zeng M, Xiong Y, Safaei N, et al. Exploring targeted degradation strategy for oncogenic KRAS (G12C) [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 19-31.
- [48] Bond MJ, Chu L, Nalawansa DA, et al. Targeted degradation of oncogenic KRASG12C by VHL-recruiting PROTACs [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6: 1367-1375.
- [49] Hata AN, Shaw AT. Resistance looms for KRAS (G12C) inhibitors [J]. *Nat Med*, 2020, 26: 169-170.
- [50] Xue JY, Zhao Y, Aronowitz J, et al. Rapid non-uniform adaptation to conformation-specific KRAS (G12C) inhibition [J]. *Nature*, 2020, 577: 421-425.