

基于KRAS蛋白结构的药学研究

——生物化学课程教育教学改革研究与实践

曹修恩¹, 于家璐¹, 董建树^{1,2,3,4}

¹郑州大学药学院, 河南 郑州

²郑州大学药物研究院, 河南 郑州

³郑州大学药物关键制备技术教育部重点实验室, 河南 郑州

⁴河南省药品质量控制与评价重点实验室, 河南 郑州

收稿日期: 2023年4月11日; 录用日期: 2023年7月21日; 发布日期: 2023年7月31日

摘要

目的: 本项目通过将生物化学领域里的结构生物学知识应用于药学研究, 拓展了基于结构的药物分子分析与设计的理论与技术。通过对药物靶点蛋白结构的统计与分析, 研究了KRAS相关蛋白质结构与功能之间的关系, 以及药物分子靶向目标蛋白质的分子机制, 完成其结构与功能之间关系的分析, 指导化合物的合成, 为新药设计奠定基础。方法: 主要通过PDB、PDBePISA、UniProt等数据库和网络服务器以及Chem3D、UCSF Chimera、PyMol、Origin等软件对于KRAS相关蛋白质的一系列重要参数进行检索、计算和绘图等, 收集、整理、分析KRAS蛋白质分子的结构域功能信息, 研究药物分子靶向目标蛋白质的分子机制。结果: KRAS蛋白与其配体化合物的结合面积与化合物的分子量呈正相关(除少部分外)。此外, KRAS蛋白与其配体化合物的结合为非共价结合时, 化合物的摩尔折射率和分配系数都对其理论结合能影响不大, 几乎维持在-5 kcal/mol到5 kcal/mol之间, 而且配体化合物通常结合在Switch-II Pocket (S-IIP)附近。而当KRAS蛋白与其配体化合物的结合为共价结合时, 突变体的结合能几乎都为负值, 绝对值显著增大, 而非突变体的结合能变化不大, 依旧维持在-5 kcal/mol到5 kcal/mol之间, 且配体化合物往往结合于第12位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸附近。结论: 靶向KRAS的药物分子若能够与蛋白质中由第12位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸形成共价结合, 且分子量较大, 则其与蛋白质的结合面积相对较大、结合较为牢固、特异性更强, 或者药物分子可以以非共价结合的方式结合于S-IIP附近, 可以增强对KRAS的抑制效应。

关键词

癌症, KRAS蛋白质, KRAS-化合物复合物结构

Pharmaceutical Research Based on the Structure of KRAS Protein

—Research and Practice on Teaching Reform of Biochemistry Course

Xiuen Cao¹, Jialu Yu¹, Jianshu Dong^{1,2,3,4}

¹School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

²Institute of Drug Discovery and Development, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

³Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

⁴Key Laboratory of Henan Province for Drug Quality and Evaluation, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

Received: Apr. 11th, 2023; accepted: Jul. 21st, 2023; published: Jul. 31st, 2023

Abstract

Aim: To explore the application of structural biology technology in the medicinal research area, structures of KRAS-compound complexes are analyzed for the design of novel potent drugs. This project studies the relationship between the structure and function of KRAS gene-related proteins and the molecular mechanism of inhibitors targeting KRAS protein through structural and statistical analysis; so as to analyze the relationship between the structure and function, guide the synthesis of compounds, and lay the foundation for the design of new drugs. **Methods:** Searching, calculation and figure representation are carried out by using mainly PDB, UniProt, PDBePISA and some other websites or software, such as Chem3D, UCSF Chimera, PyMol, Origin, etc., for series of important parameters of the related proteins of the KRAS gene. To study the molecular mechanism of inhibitors targeting the KRAS protein molecule, information regarding the biophysical properties of compounds and domain function of protein of interest is collected, analyzed and summarized. **Results:** Except for a few, the interface areas between KRAS protein and its ligand compounds are positively correlated with the molecular weights of the compounds. In addition, when the binding of KRAS protein and its ligand compounds is non-covalent, the ClogP (molar refractivity or partition coefficient) value of the compounds has little effect on the theoretical binding energy, which almost remains between -5 and 5 kcal/mol. The ligand compound is often bound to the vicinity of Switch-II Pocket (S-IP). However, when the binding of KRAS protein and its ligand compound is covalent binding, the binding energy of the mutants was almost all negative and the absolute value increased significantly, while the binding energy of the non-mutants did not change significantly, still maintaining between -5 and 5 kcal/mol, and the ligand compounds tended to bind to the cysteine produced by glycine 12 mutation. **Conclusion:** If the drug molecule targeting KRAS can form covalent binding with cysteine produced by glycine 12 mutation in protein, and the molecular weight is large, the binding area with protein is relatively large, the binding is relatively firm, and the selectivity and specificity are stronger. Or, drug molecules can be bound to the vicinity of S-IIP in a non-covalently binding manner, which can enhance the inhibitory effect on KRAS.

Keywords

Cancer, KRAS Protein, Structure of KRAS-Compound Complex

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着分子生物学和结构生物学的不断发展，愈来愈多蛋白质的结构被解析出来，呈现着许多配体分

子与靶标蛋白质的相互作用。众所周知, 由于蛋白质的结构直接决定它们的功能, 具有相同功能的蛋白质通常都具有相似的空间结构[1]。因此, 对于蛋白质的功能定义, 必须根据具体的研究背景以及蛋白质所处的时空特征来选择描述的方法, 这样才有助于研究者准确高效地开展研究, 而蛋白质与配体的相互作用对于发现药物靶点、药物设计、制定治疗方案等都具有重要意义[2]。

据报道, 研究者们于 1982 年首次在膀胱癌中发现 RAS (rat sarcoma)基因的突变[3]。RAS 基因本身就是一种十分重要的致癌基因, 其在超过 30%的人类癌症中发生了突变[4] [5], 而这种突变的 RAS 基因往往是恶性肿瘤发生的主要驱动因素之一, 通常赋予肿瘤侵袭性和抗治疗性[6], 因而被研究者普遍认为是人类癌症中最常见的突变基因之一。随着研究不断深入, 研究者们发现 RAS 是控制细胞增殖和存活信号转导通路的枢纽[7] [8], 其通过与三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate; GTP)/二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate; GDP)结合形成激活/失活两种反馈机制, 以此来调控细胞内信号传递的级联反应[4] [9]。RAS 可以在鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange factor; GEF)的激活下, 通过和 GTP 结合而与许多效应因子发生相互作用。RAS 活性转换的关键在于 GTP 水解为 GDP [10], 而 GTP 的高效水解需要 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein; GAP)的参与[11]。在致癌 RAS 突变体中, GAP 的活性受损或者大大降低, 使得 RAS 维持在激活状态, 这是致癌 RAS 的信号基础[12]。由此产生的 RAS 介导的信号级联通过解除对关键细胞过程的调节(如增加增殖和抑制凋亡), 以及通过重新连接细胞代谢和促进肿瘤微环境的改变来驱动肿瘤的发生、维持和进展[13]。

而在 RAS 的三种亚型(KRAS、NRAS 和 HRAS)中, KRAS 突变最为频繁[14], 约占 RAS 突变的 85% [15], 其作为最常见的 RAS 亚型, 近年来受到了研究者的广泛关注。正常情况下, KRAS 蛋白通常只有在某些时候是有活性的, 但 KRAS 基因的突变使得蛋白的 GTP 酶活性受到影响, 与 GTP 结合后将维持在 KRAS-GTP 结合状态, 导致下游信号通路持续性激活[8], 并赋予细胞具有癌症特征的能力[16], 包括增殖能力[17]、重组细胞代谢[18]、诱导血管生成、避免凋亡[19]、激活入侵和转移以及防止免疫破坏等等[17]。据报道, 异常的 KRAS 信号在 30%左右的人类癌症中发挥着作用[20], 并且在胰腺癌[21]结肠癌[22]和肺癌[23] [24]中经常能观察到 KRAS 基因突变[25]。许多癌症的发现依赖于 KRAS 的持续表达和信号转导[26], 但是目前对于具体机制的认识十分有限。绝大多数 KRAS 致癌突变往往集中在几个热点残基上, 特别是第 12 位的甘氨酸, 其往往突变成半胱氨酸, 因此, 近年来国际上掀起了对于 KRASG12C 选择性共价抑制剂的研究浪潮[15], 这种抑制剂的发现意味着为靶向 KRAS 治疗肿瘤提供了新的可能[27]。

在过去近四十年来, KRAS 基因的突变一直是研究者们所关注的重点, 针对 KRAS 突变肿瘤的药物研究也从未停止, 但是至今没有针对 KRAS 突变肿瘤的靶向治疗药物获批上市[28]。本实验通过对 KRAS 相关蛋白质的结构与功能的分析, 研究 KRAS 蛋白与其配体化合物的结合方式和结合特点, 希望能够为靶向 KRAS 的药物设计提供有价值的指导。

2. 方法

2.1. pdb 文件

pdb 文件, 是通过 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)数据库进行检索下载的。人源 KRAS 蛋白不同 PDB 编号包含有 KRAS 蛋白质及其配体化合物的结构信息, 下载蛋白及配体化合物的 pdb 文件, 同时进行记录包括 PDB 编号(PDB Data)、突变位点、配体化合物名称(Compound)及其分子量(Molecular Weight)等信息。

2.2. CLogP 值的计算

利用 Chem3D 软件根据不同 PDB 编号所包含的配体化合物 pdb 文件, 分别计算其 CLogP Driver (Mol Refractivity)和 CLogP Driver (Partition Coefficient)值。

2.3. 理论结合能和结合面积记录

通过 PDBePISA (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>)网络服务器根据 PDB 编号检索并记录其配体化合物的理论结合能(Binding energy, ΔiG)和结合面积(Interface Area)等信息, 由于其中某些 PDB 编号所包含的配体化合物的信息不完善, 故通过 UCSF Chimera 软件对这些配体化合物进行重新编号并上传至 PDBePISA 后查询其具体参数, 同时记录下蛋白与配体化合物发生相互作用的氨基酸残基的信息。

2.4. 信息总结

通过 UniProt 数据库及 PDBePISA 网络服务器对各 PDB 编号所包含的与蛋白结合的配体化合物的信息进行总结及整理, 并绘制成 Excel 表格。

2.5. 结合方式和特点的观察

利用 UCSF Chimera、PyMol 软件观察每一个 PDB 编号下各个配体化合物与蛋白质的结合方式和结合特点, 将其分为共价结合和非共价结合两种, 保留配体化合物所在的肽链, 并对其进行保存。之后根据结合方式以及是否发生突变对其进行分类叠合, 以此观察配体化合物与蛋白质的结合情况。

2.6. 分类绘图

根据所整理的 Excel 表格, 利用 Origin 2019b 软件对其进行绘图分析, 由于所搜集的 PDB 编号及其配体化合物的信息较多, 故进行分类绘图。1) 首先根据配体化合物与蛋白质的结合方式分类: 共价结合和非共价结合两种类型, 2) 根据是否发生突变分类: 突变、非突变两种类型。由于在整理表格的过程中发现结合能存在正负的情况, 因此根据其正负情况分成初始值和绝对值两种类型, 之后再行以上分类绘图。

2.7. 分析及总结

对于所整理的表格与图表进行统计分析。根据所查阅的文献并结合整理的表格和图形, 分析化合物与蛋白质的位置信息, 并对其结合特点进行总结。

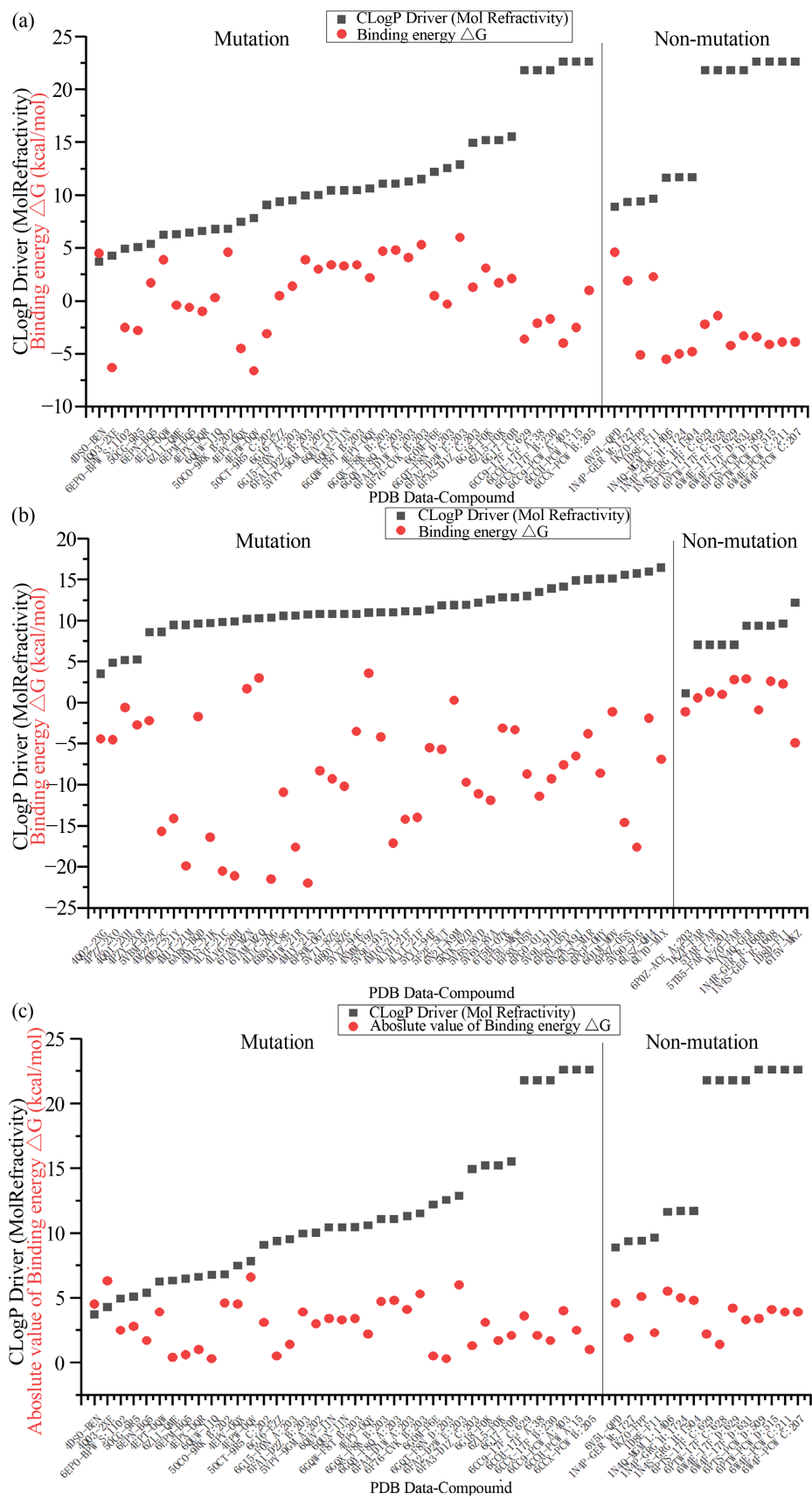
3. 结果

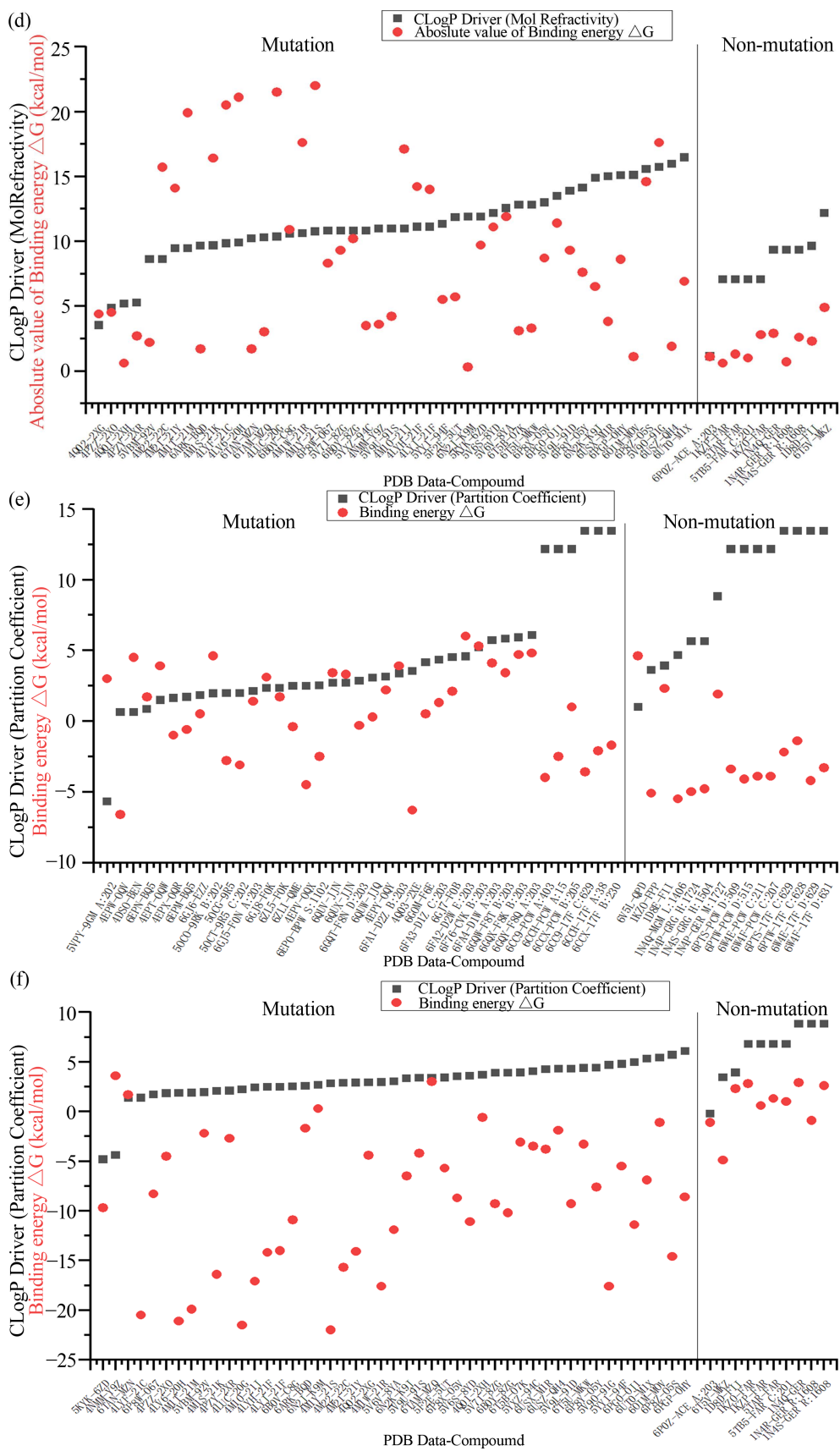
1) 在 KRAS 蛋白与其配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 除极少部分外, 其突变体的结合能几乎都为负值, 非突变体的结合能几乎都为正值(图 1、图 2)。

2) 在 KRAS 蛋白与其配体化合物的结合方式为非共价结合的情况下, 无论是否发生突变, 其 CLogP Driver (Mol Refractivity 和 Partition Coefficient)值的变化对其结合能的影响不大, 几乎维持在 -5 kcal/mol 到 5 kcal/mol 之间(图 2)。而在 KRAS 蛋白与其配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 突变体结合能的绝对值显著增大, 而非突变体的结合能变化不大, 依旧维持在 -5 kcal/mol 到 5 kcal/mol 之间。由此推测, 配体化合物的 CLogP Driver (Mol Refractivity 和 Partition Coefficient), 即摩尔折射率和分配系数对于蛋白质与其结合的相互作用影响不大, 其结合能的变化可能是由于共价结合所引起的(图 2)。

3) 无论 KRAS 蛋白与其配体化合物的结合方式(除 6CC9、6CCH、6CCX、6PTS、6PTW、6W4E、6W4F 外, 配体化合物均为 17F 和 PCW)是共价结合还是非共价结合, 且无论是否发生突变, 蛋白质与其配体化合物的结合面积与配体化合物的分子量总体呈正相关(图 2)。

4) 根据叠合后的结构图(图 3)我们可以观察到, 在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 配体化合物通常结合在第 12 位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸附近, 而在非共价结合的情况下, 配体化合物通常结合在 S-IIP 附近。





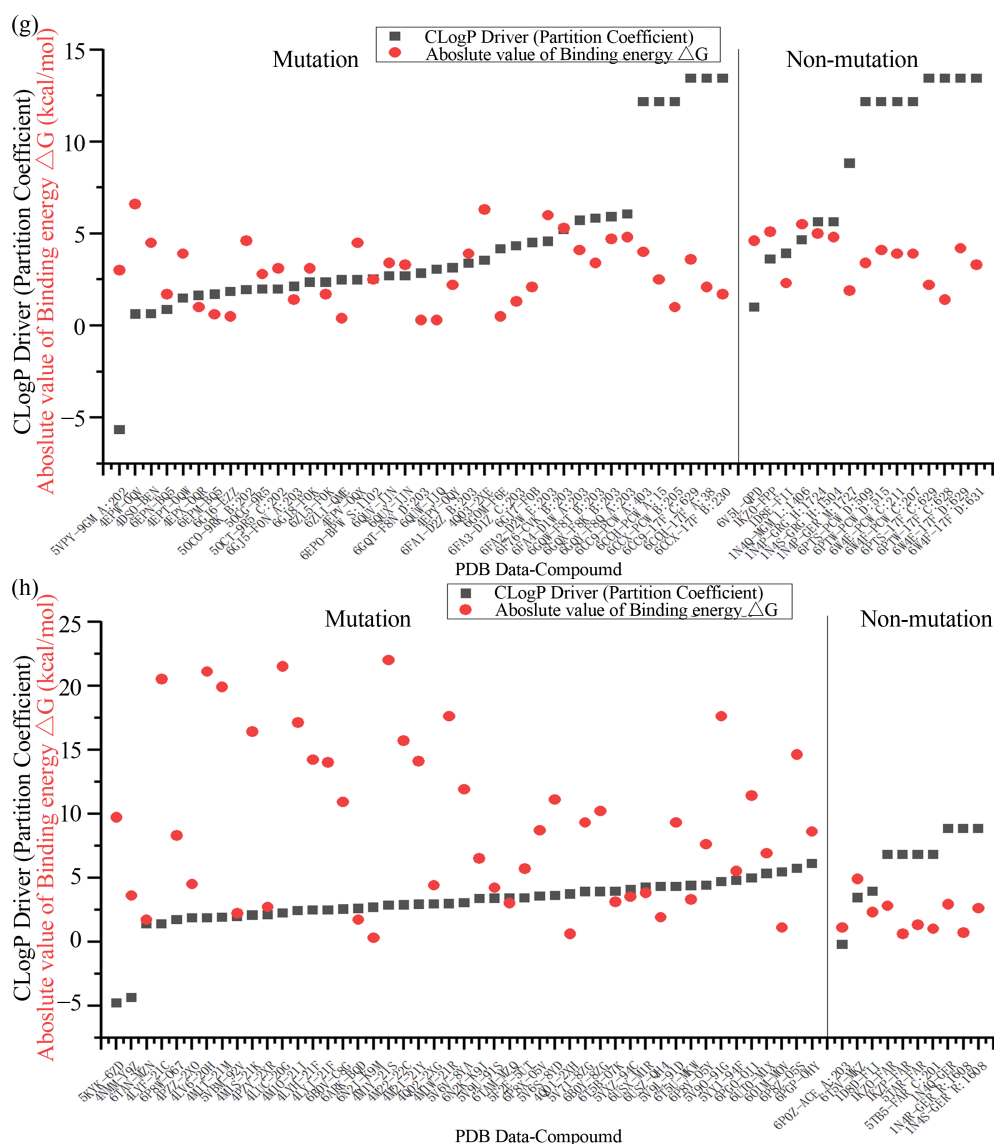
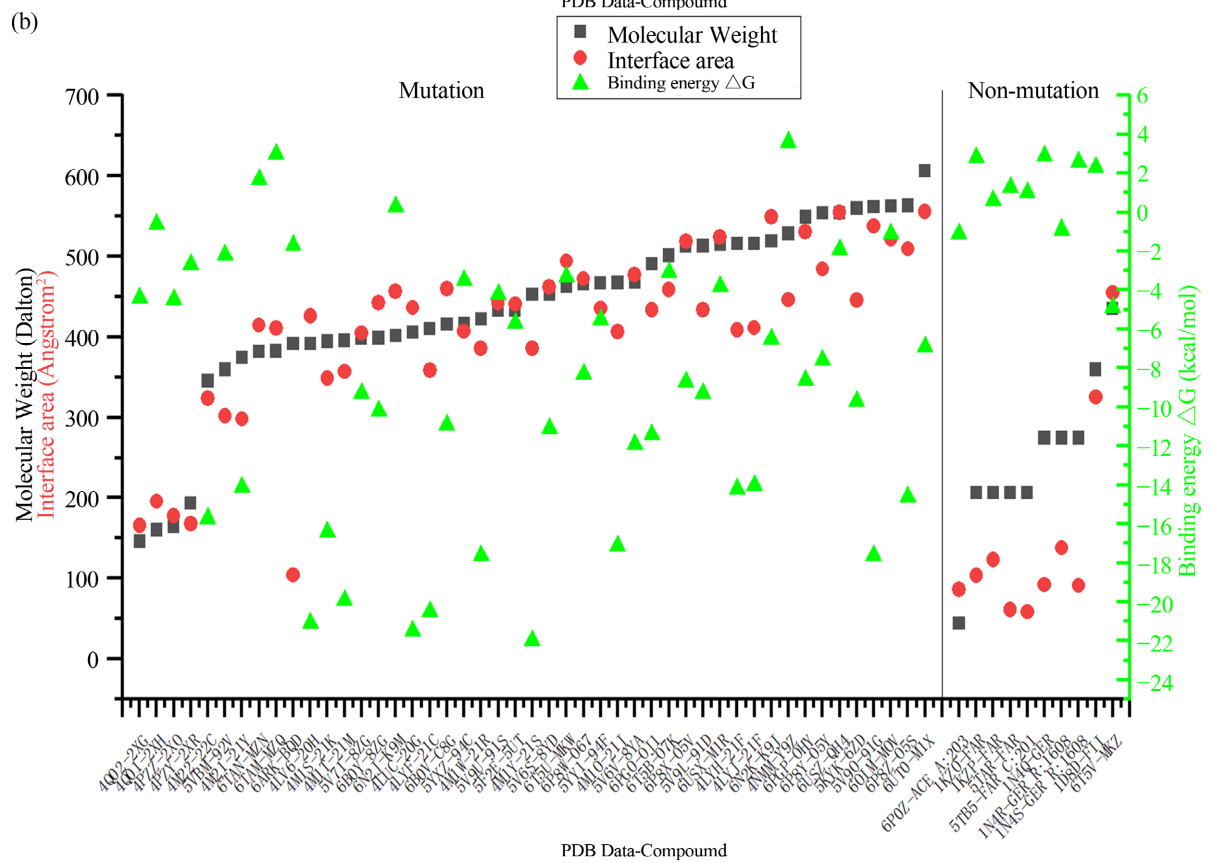
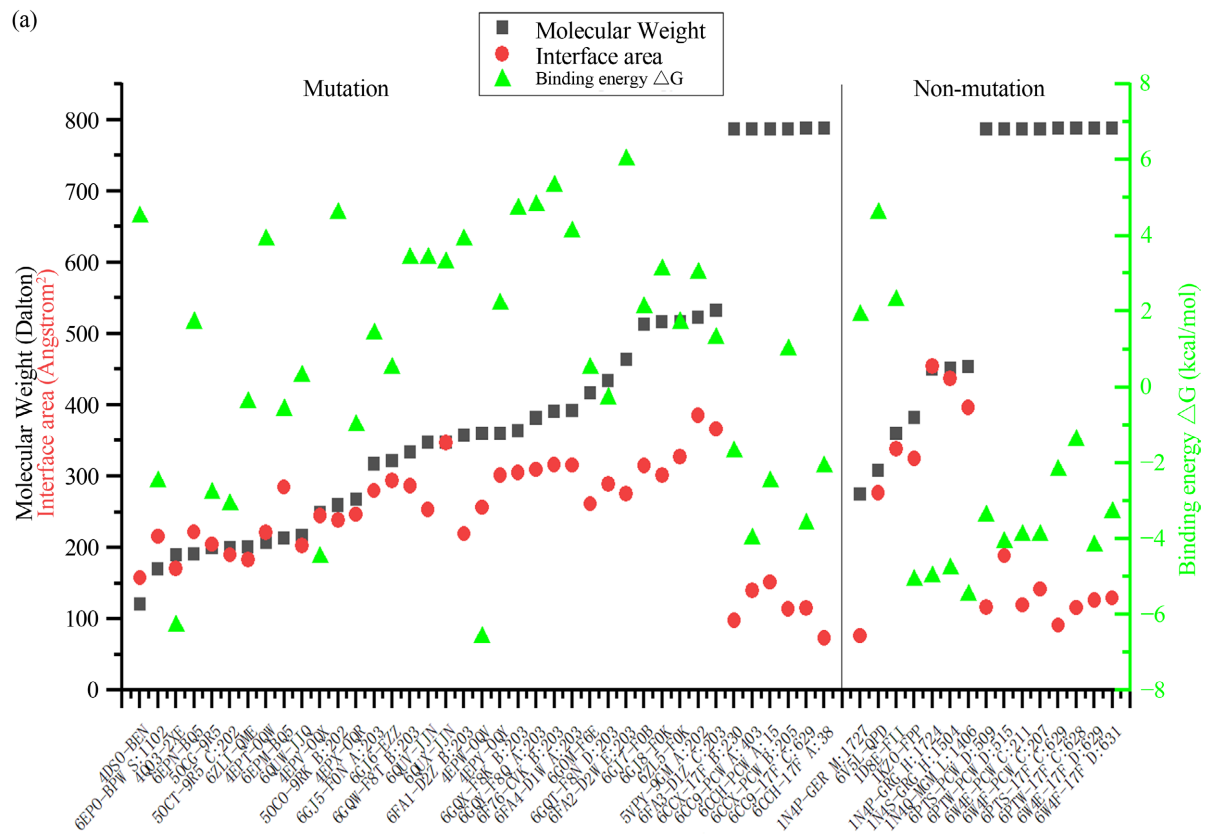


Figure 1. ClogP of compounds and their binding energy with KRAS protein
图 1. 配体化合物的 ClogP 以及化合物与 KRAS 蛋白结合能量图

通过 UniProt、PDBePISA 等数据库和网络服务器及 Origin 2019b 软件所做的 KRAS 蛋白与其配体化合物摩尔折射率和分配系数关系图。其中, (a)、(c)分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为非共价结合的情况下, (b)、(d)分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 以 CLogP Driver (Mol Refractivity)升序方式对 CLogP Driver (Mol Refractivity)和 Binding energy/Absolute value of Binding energy 所做的图形。E、G 分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为非共价结合的情况下, (f)、(h)分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 以 CLogP Driver (Partition Coefficient)升序方式对 CLogP Driver (Mol Refractivity)和 Binding energy/Absolute value of Binding energy 所做的图形。其中, CLogP Driver (Mol Refractivity)/CLogP Driver (Partition Coefficient)以黑色正方形表示, Binding energy/Absolute value of Binding energy 以红色圆形表示。X 轴为 PDB Data-Compound, Y 轴分别为 CLogP Driver (Mol Refractivity)和 Binding energy/Absolute value of Binding energy、CLogP Driver (Partition Coefficient)和 Binding energy/Absolute value of Binding energy。



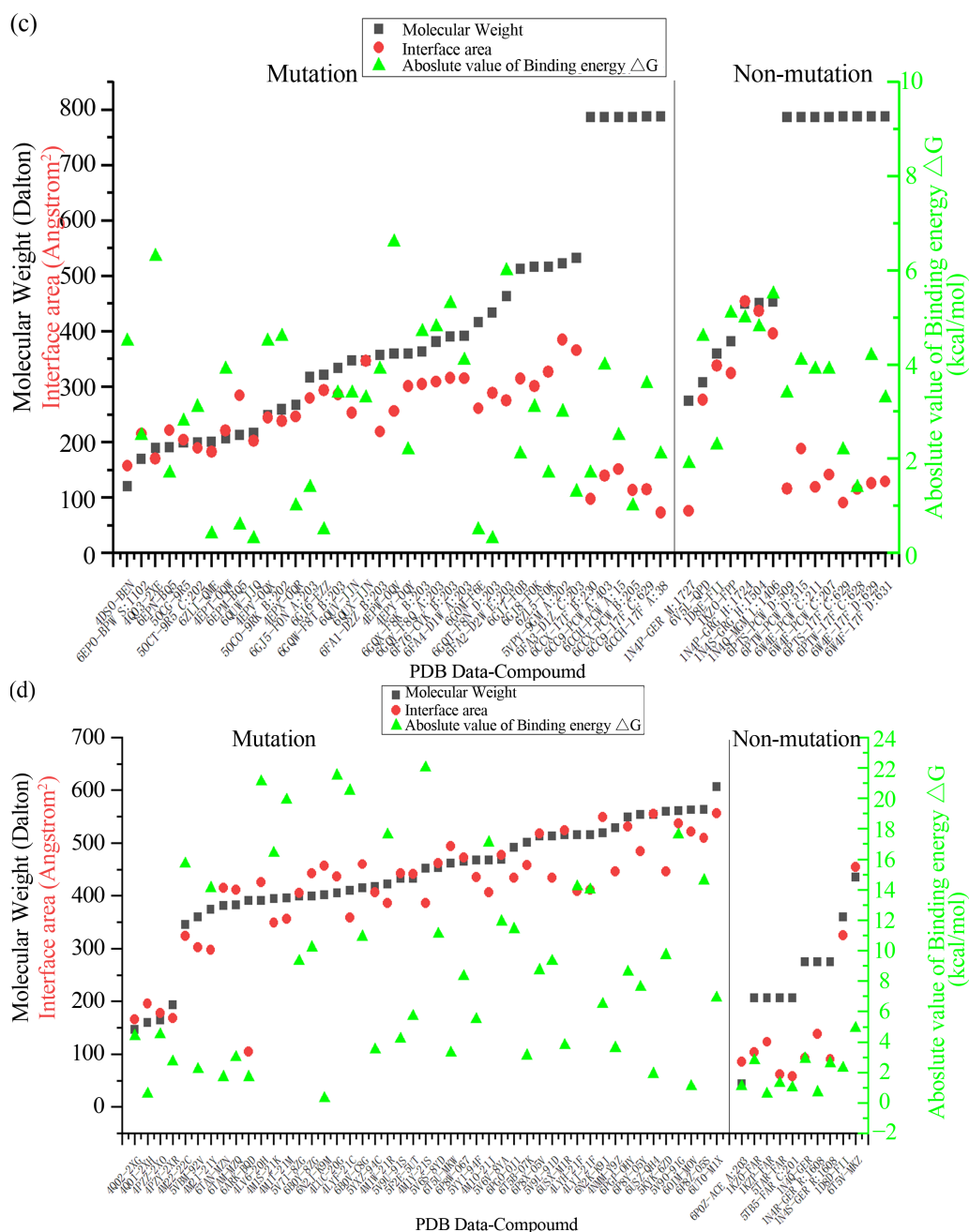


Figure 2. Interaction (Molecular weight, interface area and binding energy) between KRAS and compounds
图 2. KRAS 蛋白质与其配体化合物相互作用参数图(分子量、结合面积、结合能量)

通过 UniProt、PDBePISA 等数据库和网络服务器及 Origin 2019b 软件所做的 KRAS 蛋白质与其配体化合物相互作用参数图。其中, (a)、(c)分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为非共价结合的情况下, (b)、(d)分别是在 KRAS 蛋白与配体化合物的结合方式为共价结合的情况下, 以 Molecular Weight 升序方式对 Molecular Weight、Interface area 和 Binding energy (Absolute value of Binding energy)所做的图形。其中, Molecular Weight 以黑色正方形表示, Interface area 以红色圆形表示, Binding energy (Absolute value of Binding energy)以绿色三角形表示。X 轴为 PDB Data-Compound, 左侧 Y 轴为 Molecular Weight 和 Interface area, 右侧 Y 轴为 Binding energy (Absolute value of Binding energy)。

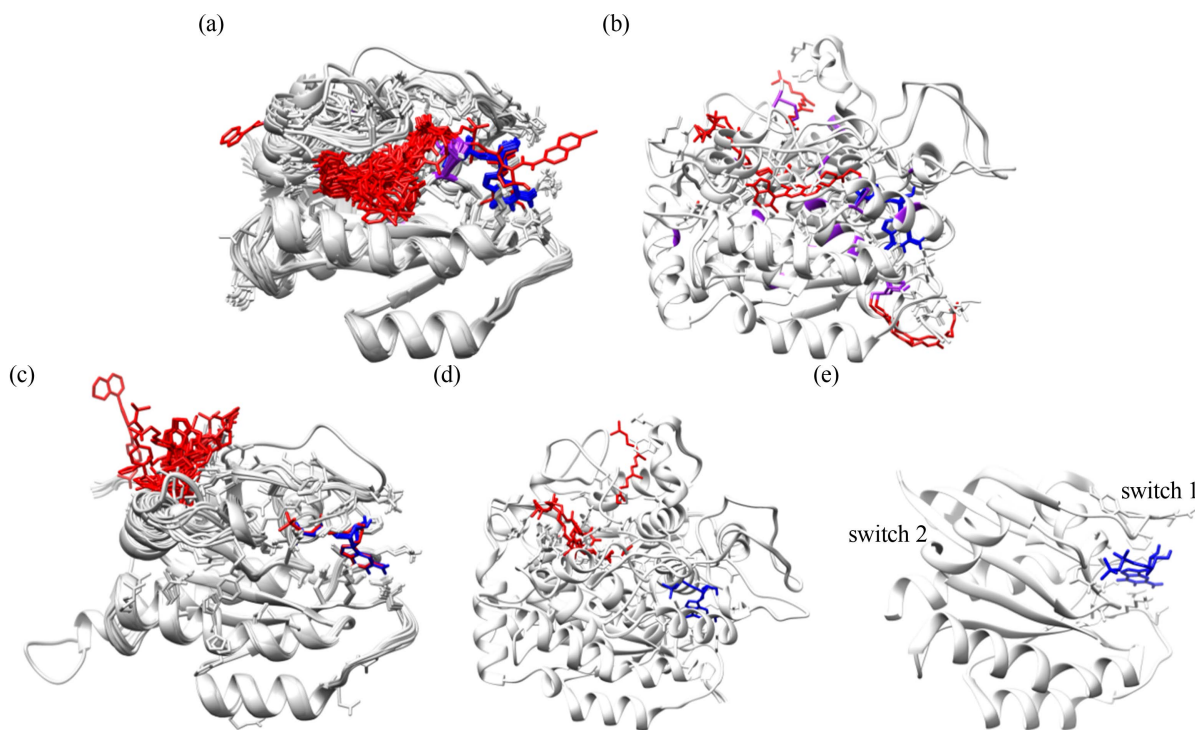


Figure 3. Superposition of classified KRAS structures

图 3. KRAS 蛋白分类叠合结构图

通过 UniProt 数据库及 UCSF Chimera 软件所做的 KRAS 蛋白分类叠合后的结构图。其中，白色部分为肽链，蓝色部分为 GDP，红色部分为配体化合物，紫色部分为半胱氨酸(图(a)中紫色部分是由第 12 位的甘氨酸突变而来半胱氨酸)。(a)、(b)分别是在 KRAS 蛋白的突变体和非突变体与其配体化合物的结合方式为共价结合的情况，(c)、(d)分别是在 KRAS 蛋白的突变体和非突变体与其配体化合物的结合方式为非共价结合的情况。(e)是 KRAS-GTP 结合状态的结构图(PDB: 4LPK)。PDB: Protein Data Bank。

4. 讨论

蛋白质作为人体内的一种重要物质，参与重大生命活的执行和调节[1] [2]，导致疾病发生的重要原因之一，就是蛋白质分子结构的异常和功能的偏差。由于 RAS 蛋白质中的各种突变改变了蛋白质的动力学特征，因此会不同程度地影响其活性和功能。这些突变扰乱了编码蛋白的内在生化特性，从而导致细胞信号传导、增殖、存活和对生长因子的反应异常[14]。KRAS 的突变导致其处于激活状态的水平提高[29]，并最终通过下游效应途径导致细胞扩增[30]，从而诱导肿瘤的发生[31]。通过信息搜集与数据统计，我们发现绝大多数的致癌突变集中在第 12 位的甘氨酸、第 13 位的甘氨酸以及第 61 位的谷氨酰胺这三个氨基酸残基上[32] [33]，尤其是第 12 位的甘氨酸。除此之外，在大约 15% 的非小细胞肺癌、3% 的结肠直肠癌和 1% 的胰腺癌中观察到了 KRASG12C 突变[34]。这些残基的突变损害了 GTPase 的内在活性，从而提高了细胞内 KRAS-GTP 水平，导致下游效应通路异常激活[32]。具体来说，第 12 位的甘氨酸(G12)的突变能够通过干扰 GAP 的结合以及 GAP 刺激的 GTP 水解两方面导致 RAS 处于激活状态[25]，从而促进肿瘤发生和肿瘤恶化。

在我们所收集的数据中，非突变型占 19.42%，突变型占 80.58%，突变型中 G12C 占 54.22%、Q61H 占 14.46%、G12D 占 13.25%、G12V 占 10.05%，且 G12C 突变型中的蛋白质与其配体化合物的结合方式绝大部分为共价结合。由此可见，第 12 位的甘氨酸突变为半胱氨酸的现象占全部突变类型中的比例较高。

同时, 这些能够与突变产生的半胱氨酸形成共价键的小分子证明了直接和选择性靶向突变型 KRAS 蛋白的可能性, 与野生型蛋白相比具有明显的特异性优势。此外, 由于任意抑制野生型和突变型 KRAS 都有可能产生毒副反应[35], 因此仅针对突变蛋白的抑制可以避免这一潜在障碍[36]。实现突变特异性方法之一是通过将抑制剂共价附着在突变残基上, 半胱氨酸是亲核作用最强的氨基酸, 可以作为亲核试剂与多种物质形成共价键[37]。由此可见, KRAS 中第 12 位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸既是肿瘤的驱动因子之一, 同时由于其在癌症中出现的较高频率, 也是治疗 KRAS 突变型肿瘤的理想靶点之一[37]。

尽管 KRAS 在肿瘤中的重要性已被公认, 但是在过去近四十年的持续努力下仍然没有开发出批准治疗 KRAS 突变型癌症的疗法, 直到最近几年才开发出在临床试验前显示出良好前景的化合物[38]。根据文献报道, 造成 KRAS 突变体成为一个难以靶向的靶点的原因之一, 就是 KRAS 蛋白表面平滑, 缺乏任何可以使小分子紧密结合的深层疏水囊[39]。

在 RAS 蛋白中, 氨基酸 1~166 组成 GTPase 结构域(G-domain), 氨基酸 167~188 组成高度可变区域 (highly variable region, HVR) [40]。G 结构域包括 P-loop (氨基酸残基 10~17)、Switch 1 (SW1, 氨基酸残基 30~40)和 Switch 2 (SW2, 氨基酸残基 60~75)等区域[12], 其中 SW1 和 SW2 对于 RAS 的活性至关重要。在 RAS 的各亚型中, G 结构域序列和结构几乎相同而 HVR 的序列存在显著差异[41]。而所研究的不可逆抑制剂能够以突变产生的半胱氨酸作为进攻的主要目标, 共价结合于突变残基上能够减少药物分子对结合腔的依赖, 从而在一定程度上克服了 RAS 蛋白表面缺乏结合口袋的问题, SW1 主要与下游效应因子相互作用, 如 RAF、PI3K, SW2 主要参与 GTP 水解[42]。而第 12 位的甘氨酸位于 SW1、SW2 以及 P-loop 的交界区域, 由此推测, 抑制 G12C 有很大可能对 RAS 构象和活性产生重要影响。据有关报道, 大多数化合物都共价连接到突变产生的半胱氨酸的硫醇基团上[43], 并没有占据核苷酸口袋。相反, 化合物所延伸到相邻的口袋主要由 SW2 形成, 这个新的结合位点后来被称为 S-IIP [44]。S-IIP 位于 RAS 的中央 β 折叠和 SW2 之间, 通过配体结合诱导 SW2 的重新排列而形成的。同时, KRAS 第 12 位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸(G12C)位于该口袋附近[45], 且该口袋存在于 KRAS-GTP 结合形式中[46]。除了二硫键外, S-IIP 还可以与抑制剂直接接触, 以此成为进一步药物设计的立足点。S-IIP 的发现使得人类在治疗 KRAS 突变肿瘤的道路上迈出了重要一步。

当前, 各项研究的最新进展为 KRAS 的药物化提供了新的思路, 其中一个前沿突破便是针对突变而成的半胱氨酸即 G12C 共价抑制剂的设计[47], 由于它们对于突变产生的半胱氨酸的高度特异性和不可逆的共价结合性质, 能够表现出更好的选择性和较强的效力[27]。主要原因在于 KRASG12C 作为癌症中最常见的三种 RAS 突变体之一, 其含有一种非原生的半胱氨酸残基, 可以通过靶向实现对蛋白的特异性。由于野生型 KRAS 在活性位点处缺乏半胱氨酸, 而第 12 位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸位于核苷酸囊袋的边缘, 便于抑制剂设计。而根据对半胱氨酸共价结合抑制剂的研究, KRASG12C 可以作为治疗 RAS 突变的理想靶点。在 KRASG12C 中, 第 12 号位的甘氨酸突变为半胱氨酸[42], 若药物分子能够与这种突变产生的半胱氨酸结合, 则可以减少药物分子对于结合腔的依赖, 且能够获得相对较高的特异性。此外, 考虑到其突变体特异性的结合模式, 共价抑制剂能够表现出更高的选择性, 从而使得 KRAS 突变肿瘤的靶向治疗成为可能。

5. 总结和展望

综上所述, 靶向 KRAS 的药物分子若能够与蛋白质中第 12 位的甘氨酸突变产生的半胱氨酸形成共价结合, 且分子量较大, 则其与蛋白质的结合面积相对较大、结合较为牢固、选择性和特异性更强, 或者药物分子可以以非共价结合的方式结合于 S-IIP 附近, 可增强对 KRAS 的抑制效应。

在本课题中, 我们探究了 KRAS 相关蛋白质与配体化合物的结合方式及其特点, 并根据结合方式、

是否发生突变等方式进行分类讨论，初步总结了蛋白与配体化合物之间的结合规律，希望能够对 KRAS 突变肿瘤的靶向治疗提供有价值的参考。

RAS 基因的突变是癌症中最常见的突变之一，由此产生的活化的 RAS 蛋白是肿瘤发生和生长的有力驱动力[18]。针对这些关键性的蛋白质的努力虽然已经持续了近四十年，但迄今为止还没有获得批准的 RAS 靶向疗法。本实验主要通过 UniProt、PDBePISA 等数据库和网络服务器对 KRAS 相关蛋白及其配体化合物的物理化学参数信息进行收集、整理、总结，然后利用 UCSF Chimera、PyMol 及 Origin 2019b 软件进行观察、绘图、分析，研究 KRAS 蛋白的突变型和非突变型的结合方式及结合特点，希望能够为靶向 KRAS 的治疗药物设计提供有价值的指导。

尽管在过去近四十年来，研究者在理解致癌 KRAS 突变的机制和结果方面取得了显著进展，但是人类仍然只是在征服 KRAS 突变癌症的漫长路上前进了一小步[15]。这些化合物可能具有我们还未发现的、未知的作用机制，如直接或间接作用于 KRAS 的抑制剂，但这代表着一个非凡的临床需求和机会，将比曾经的尝试更加有利。在新药难觅的今天，如果能够在靶向 KRAS 上实现突破，尽管只是一小步，也令人无比欣慰。目前，虽然已有不少靶向 KRASG12C 的药物处于临床试验阶段，但是具体表现仍然不是那么完美，还需要更多的研究者共同努力，相信终有一天我们的目标能够实现。

总而言之，尽管开发针对 KRAS 突变癌症的有效治疗策略对于研究者们而言是一项令人望而生畏的举措[39] [48]，但是随着新知识、新思想、新策略、新药物的出现，新的方向给这个领域带来了希望，迄今为止所发现的有关信息为未来的挑战和机遇提供了丰富而有益的研究背景，将帮助越来越多的研究者更好地理解 KRAS 在癌症中的作用机制。我们相信，能够直接靶向 KRAS 且已获批的药物的出现将为广大患者带来显著的临床收益，我们也将时刻关注当前的临床研究，期望为靶向 KRAS 的治疗药物地设计提供更多、更广泛的思路。

致 谢

本研究与本论文得到郑州大学教育教学改革研究与实践项目留学生教育专项基金项目的资助，生物化学留学生课程教育教学改革研究与实践，项目批准号 2022ZZUJGXMLXS-031。感谢国家超级计算郑州中心的支持，感谢郑州大学 2023 年大学生创新创业训练计划项目的支持，创新训练项目编号 202310459149，感谢康磊、李蝶、陈申、骆宸冰的帮助。

参考文献

- [1] Hawkins, T. and Kihara, D. (2007) Function Prediction of Uncharacterized Proteins. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, **5**, 1-30. <https://doi.org/10.1142/S0219720007002503>
- [2] Cruz L.M., Trefflich, S., Weiss, V.A. and Castro, M.A.A. (2017) Protein Function Prediction. In: Kaufmann, M., Klinger, C. and Savelsbergh, A., Eds., *Functional Genomics*, Humana Press, New York, 55-75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7231-9_5
- [3] Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C. and Weinberg, R.A. (1982) Human EJ Bladder Carcinoma Oncogene Is Homologue of Harvey Sarcoma Virus Ras Gene. *Nature*, **297**, 474-478. <https://doi.org/10.1038/297474a0>
- [4] Hunter J.C., Gurbani, D., Ficarro, S.B., Carrasco, M.A., Lim, S.M., Choi, H.G., Xie, T., Marto, J.A., Chen, Z., Gray, N.S. and Westover, K.D. (2014) *In Situ* Selectivity Profiling and Crystal Structure of SML-8-73-1, an Active Site Inhibitor of Oncogenic K-Ras G12C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 8895-8900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404639111>
- [5] Hunter J.C., Manandhar, A., Carrasco, M.A., Gurbani, D., Gondi, S. and Westover, K.D. (2015) Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Molecular Cancer Research*, **13**, 1325-1335. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>
- [6] McGee, J.H., Shim, S.Y., Lee, S.J., Swanson, P.K., Jiang, S.Y., Durney, M.A. and Verdine, G.L. (2018) Exceptionally High-Affinity Ras Binders That Remodel Its Effector Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **293**, 3265-3280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.816348>

- [7] Kauke, M.J., Traxlmayr, M.W., Parker, J.A., Kiefer, J.D., Knihtila, R., McGee, J., Verdine, G., Mattos, C. and Wittrup, K.D. (2017) An Engineered Protein Antagonist of K-Ras/B-Raf Interaction. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 5831. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05889-7>
- [8] Dhirendra, K.S., Dwight, V.N. and Frank, M. (2017) RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, **170**, 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- [9] Lu, S.Y., Jang, H., Gu, S., Zhang, J. and Nussinov, R. (2016) Drugging Ras GTPase: A Comprehensive Mechanistic and Signaling Structural View. *Chemical Society Reviews*, **45**, 4929-4952. <https://doi.org/10.1039/C5CS00911A>
- [10] Maurer, T., Garrenton, L.S., Oh, A., Pitts, K., Anderson, D.J., Skelton, N.J., Fauber, B.P., Pan, B., Malek, S., Stokoe, D., Ludlam, M.J.C., Bowman, K.K., Wu, J.S., Giannetti, A.M., Starovasnik, M.A., Mellman, I., Jackson, P.K., Rudolph, J., Wang, W.R. and Fang, G.W. (2012) Small-Molecule Ligands Bind to a Distinct Pocket in Ras and Inhibit SOS-Mediated Nucleotide Exchange Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 5299-5304.
- [11] Hillig, R.C., Sautier, B., Schroeder, J., Moosmayer, D., Hilpmann, A., Stegmann, C.M., Werbeck, N.D., Briem, H., Boemer, U., Weiske, J., Badock, V., Mastouri, J., Petersen, K., Siemeister, G., Kahmann, J.D., Wegener, D., Böhnke, N., Eis, K., Graham, K., Wortmann, L., von Nussbaum, F. and Bader, B. (2019) Discovery of Potent SOS1 Inhibitors That Block RAS Activation via Disruption of the RAS-SOS1 Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 2551-2560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812963116>
- [12] 李歆, 王义俊, 刘平羽. 特异靶向 KRAS-G12C 突变的抗肿瘤药物研究进展[J]. *药学报*, 2021, 56(2): 374-382. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2020-1485>
- [13] Mukhopadhyay, S., Vander, H.M.G. and McCormick, F. (2021) The Metabolic Landscape of RAS-Driven Cancers from Biology to Therapy. *Nature Cancer*, **2**, 271-283. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00184-x>
- [14] Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G. (2007) Hyperactive Ras in Developmental Disorders and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **7**, 295-308. <https://doi.org/10.1038/nrc2109>
- [15] Liu, P.Y., Wang, Y.J. and Li, X. (2019) Targeting the Untargetable KRAS in Cancer Therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **9**, 871-879. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>
- [16] Douglas, H. and Robert, A.W. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [17] Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. and Bar-Sagi, D. (2011) RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web. *Nature Reviews Cancer*, **11**, 761-774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- [18] Ying, H.Q., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S.J., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H.L., Coloff, J.L., Yan, H.Y., Wang, W., Chen, S.J., Viale, A., Zheng, H.W., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A.R., Martin, E.S., Chang, J., Hezel, A.F., Perry, S.R., Hu, J., Gan, B.Y., Xiao, Y.H., Asara, J.M., Weissleder, R., Wang, Y.A., Chin, L., Cantley, L.C. and DePinho, R.A. (2012) Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell*, **149**, 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>
- [19] Weijzen, S., Velders, M.P. and Kast, W.M. (1999) Modulation of the Immune Response and Tumor Growth by Activated Ras. *Leukemia*, **13**, 502-513. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401367>
- [20] Patricelli, M.P., Janes, M.R., Li, L.S., Hansen, R., Peters, U., Kessler, L.V., Chen, Y., Kucharski, J.M., Feng, J., Ely, T., Chen, J.H., Firdaus, S.J., Babbar, A., Ren, P.D. and Liu, Y. (2016) Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discovery*, **6**, 316-329. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1105>
- [21] Bryant, K.L., Mancias, J.D., Kimmelman, A.C. and Der, C.J. (2014) KRAS: Feeding Pancreatic Cancer Proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, **39**, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- [22] Hofmann, M.H., Gerlach, D., Misale, S., Petronczki, M. and Kraut, N. (2022) Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discovery*, **12**, 924-937. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.c.6549598.v1>
- [23] Haigis, K.M. (2017) KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends in Cancer*, **3**, 686-697. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.006>
- [24] Reck, M., Carbone, D.P., Garassino, M. and Barlesi, F. (2021) Targeting KRAS in Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Progress and New Approaches. *Annals of Oncology*, **32**, 1101-1110. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.001>
- [25] Sun, Q., Burke, J.P., Phan, J., Burns, M.C., Olejniczak, E.T., Waterson, A.G., Lee, T., Rossanese, O.W. and Fesik, S.W. (2012) Discovery of Small Molecules That Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 6140-6143. <https://doi.org/10.1002/anie.201201358>
- [26] Wu, H.Z., Xiao, J.Q., Xiao, S.S. and Cheng, Y. (2019) KRAS: A Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **19**, 2081-2097. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190905164144>
- [27] Ni, D., Li, X.Y., He, X.H., Zhang, H., Zhang, J. and Lu, S.Y. (2019) Drugging K-Ras G12C through Covalent Inhibi-

- tors: Mission Possible? *Pharmacology and Therapeutics*, **202**, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.06.007>
- [28] Gupta, A.K., Wang, X., Pagba, C.V., Prakash, P., Sarkar-Banerjee, S., Putkey, J. and Gorfe, A.A. (2019) Multi-Target, Ensemble-Based Virtual Screening Yields Novel Allosteric KRAS Inhibitors at High Success Rate. *Chemical Biology & Drug Design*, **94**, 1441-1456. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13519>
- [29] Huang, L.M., Guo, Z.X., Wang, F. and Fu, L.W. (2021) KRAS Mutation: From Undruggable to Druggable in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**, Article No. 386. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4>
- [30] Yan, W.P., Markegard, E., Dharmaiiah, S., Urisman, A., Drew, M., Esposito, D., Scheffzek, K., Nissley, D.V., McCormick, F. and Simanshu, D.K. (2020) Structural Insights into the SPRED1-Neurofibromin-KRAS Complex and Disruption of SPRED1-Neurofibromin Interaction by Oncogenic EGFR. *Cell Reports*, **32**, Article ID: 107909. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107909>
- [31] Nnadi, C.I., Jenkins, M.L., Gentile, D.R., Bateman, L.A., Zaidman, D., Balius, T.E., Nomura, D.K., Burke, J.E., Shokat, K.M. and Nir, L. (2018) Novel K-Ras G12C Switch-II Covalent Binders Destabilize Ras and Accelerate Nucleotide Exchange. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **58**, 464-471. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00399>
- [32] Kettle, J.G., Bagal, S.K., Bickerton, S., Bodnarchuk, M.S., Breed, J., Carbajo, R.J., Cassar, D.J., Chakraborty, A., Cosulich, S., Cumming, I., Davies, M., Eatherton, A., Evans, L., Feron, L., Fillery, S., Gleave, E.S., Goldberg, F.W., Harlfinger, S., Hanson, L., Howard, M., Howells, R., Jackson, A., Kemmitt, P., Kingston, J.K., Lamont, S., Lewis, H.J., Li, S., Liu, L., Ogg, D., Phillips, C., Polanski, R., Robb, G., Robinson, D., Ross, S., Smith, J.M., Tonge, M., Whiteley, R., Yang, J., Zhang, L. and Zhao, X. (2020) Structure-Based Design and Pharmacokinetic Optimization of Covalent Allosteric Inhibitors of the Mutant GTPase KRASG12C. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 4468-4483. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01720>
- [33] Dirk, K., Andreas, B., Jark, B., Gerhard, F., Sandra, D., Melanie, H., Barbara, M., Alexander, W.P. and McConnell, D.B. (2020) Drugging All RAS Isoforms with One Pocket. *Future Medicinal Chemistry*, **12**, 1911-1923. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0221>
- [34] Hansen, R., Peters, U., Babbar, A., Chen, Y., Feng, J., Janes, M.R., Li, L.S., Ren, P., Liu, Y. and Zarrinkar, P.P. (2018) The Reactivity-Driven Biochemical Mechanism of Covalent KRASG12C Inhibitors. *Nature Structural & Molecular Biology*, **25**, 454-462. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0061-5>
- [35] Goebel, L., Mueller, M.P., Goody, R.S. and Rauh, D. (2020) KRASG12C Inhibitors in Clinical Trials: A Short Historical Perspective. *RSC Medicinal Chemistry*, **11**, 760-770. <https://doi.org/10.1039/D0MD00096E>
- [36] Ostrem, J.M.L. and Shokat, K.M. (2016) Direct Small-Molecule Inhibitors of KRAS: From Structural Insights to Mechanism-Based Design. *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**, 771-785. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.139>
- [37] Mishto, M., Mansurkhodzhaev, A., Ying, G., Bitra, A., Cordfunke, R.A., Henze, S., Paul, D., Sidney, J., Urlaub, H., Neefjes, J., Sette, A., Zajonc, D.M. and Liepe, J. (2019) An *in Silico*—*in Vitro* Pipeline Identifying an HLA-A*02: 01⁺ KRAS G12V⁺ Spliced Epitope Candidate for a Broad Tumor-Immune Response in Cancer Patients. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article 2572. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02572>
- [38] Kwan, A.K., Piazza, G.A., Keeton, A.B. and Leite, C.A. (2022) The Path to the Clinic: A Comprehensive Review on Direct KRASG12C Inhibitors. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **41**, Article No. 27. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02225-w>
- [39] Cox, A.D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J. and Der, C.J. (2014) Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, **13**, 828-851. <https://doi.org/10.1038/nrd4389>
- [40] Désage, A.L., Léonce, C., Swalduz, A. and Ortiz, C.S. (2022) Targeting KRAS Mutant in Non-Small Cell Lung Cancer: Novel Insights into Therapeutic Strategies. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 796832. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.796832>
- [41] 许伊钊, 文辉, 崔华清. KRAS 抑制剂的研 究进展[J]. 药 学学报, 2021, 56(6): 1562-1570. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2020-1834>
- [42] Bera, A.K., Lu, J., Lu, C., Li, L., Gondi, S., Yan, W., Nelson, A., Zhang, G. and Westover, K.D. (2020) GTP Hydrolysis Is Modulated by Arg34 in the RASopathy-Associated KRAS^{P34R}. *Birth Defects Research*, **112**, 708-717. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1647>
- [43] Lu, J., Harrison, R.A., Li, L., Zeng, M., Gondi, S., Scott, D., Gray, N.S., Engen, J.R. and Westover, K.D. (2017) KRAS G12C Drug Development: Discrimination between Switch II Pocket Configurations Using Hydrogen/Deuterium-Exchange Mass Spectrometry. *Structure*, **25**, 1442-1448.E3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.003>
- [44] Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A. and Shokat, K.M. (2013) K-Ras (G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions. *Nature*, **503**, 548-551. <https://doi.org/10.1038/nature12796>
- [45] Janes, M.R., Zhang, J.C., Li, L.S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y.C., Babbar, A., Firdaus, S.J., Darjania, L., Feng, J., Chen, J.H., Li, S.W., Li, S.S., Long, Y.O., Thach, C., Liu, Y., Zariw, A., Ely, T., Kucharski, J.M., Kessler, L.V., Wu, T., Yu, K., Wang, Y., Yao, Y., Deng, X.H., Zarrinkar, P.P., Brehmer, D., Dhanak, D., Lorenzi, M.V.,

- Hu-Lowe, D., Patricelli, M.P., Ren, P. and Liu, Y. (2018) Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell*, **172**, 578-589.E17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.006>
- [46] Canon, J., Rex, K., Saiki, A.Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C.G., Koppada, N., Lanman, B.A., Werner, J., Rapaport, A.S., San, M.T., Ortiz, R., Osgood, T., Sun, J.R., Zhu, X., McCarter, J.D., Volak, L.P., Houk, B.E., Fakih, M.G., O'Neil, B.H., Price, T.J., Falchook, G.S., Desai, J., Kuo, J., Govindan, R., Hong, D.S., Ouyang, W., Henary, H., Arvedson, T., Cee, V.J. and Lipford, J.R. (2019) The Clinical KRAS(G12C) Inhibitor AMG 510 Drives Anti-Tumour Immunity. *Nature*, **575**, 217-223. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1694-1>
- [47] Boike, L., Henning, N.J. and Nomura, D.K. (2022) Advances in Covalent Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **21**, 881-898. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00542-z>
- [48] Wang, H., Chi, L.L., Yu, F.Q., Dai, H.L., Gao, C., Si, X.J., Wang, Z.J., Liu, L.M., Zheng, J.X., Shan, L.H., Liu, H.M. and Zhang, Q.R. (2023) Annual Review of KRAS Inhibitors in 2022. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **249**, Article ID: 115124. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115124>