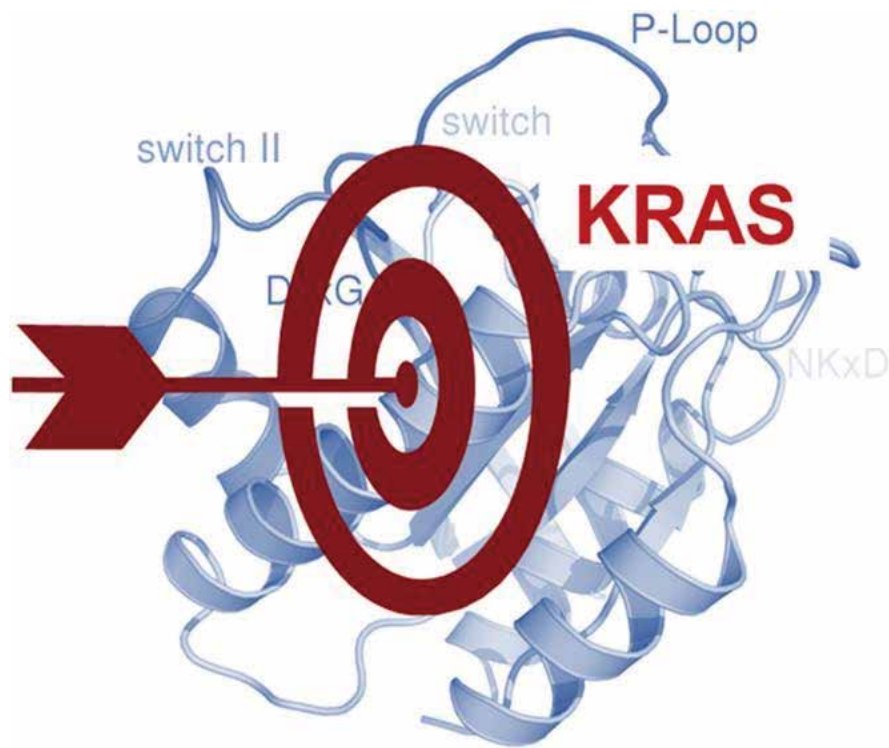


美迪西KRAS新药研发服务

RAS是人类癌症中最常出现突变的致癌基因之一。KRAS是最常见的突变亚型,约占RAS突变的85%。KRAS作为最常见的RAS突变亚型,近年来得到了广泛的研究。

在KRAS研究项目计划的制定中,美迪西与客户进行了深入的沟通。科研骨干结合每个案例的特点,结合多年的实践经验和
技术积累,向客户提交了高质量的实验方案和数据结果。美迪西可提供KRAS靶向药物发现、CMC研究(API+制剂)、药效学
研究、PK研究、安全性评价等服务。



靶向不可成药靶点KRAS^{G12C}

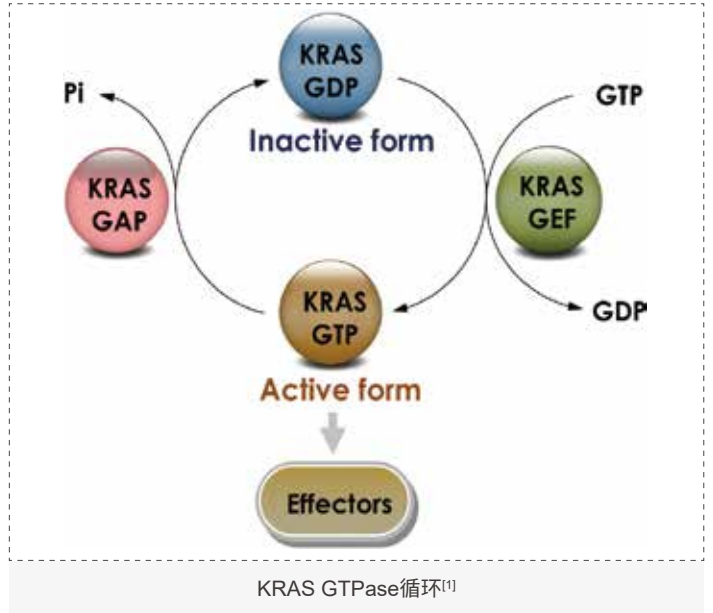
KRAS 简介

RAS是GTPase原癌基因家族成员,包括三个密切相关的RAS亚型:HRAS、KRAS和NRAS。在所有RAS亚型中,KRAS突变频率最高,其次是NRAS和HRAS。KRAS突变在胰腺癌、肺癌和结直肠癌中尤为常见。在癌症中最常发生突变的残基是G12、G13和Q61。KRAS蛋白存在两种剪接变体KRAS4A和KRAS4B,其中KRAS4B在人类细胞中占主导地位。

KRAS(Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog, Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物)基因是编码GTP/GDP结合蛋白的原癌基因,属于GTPase RAS家族。

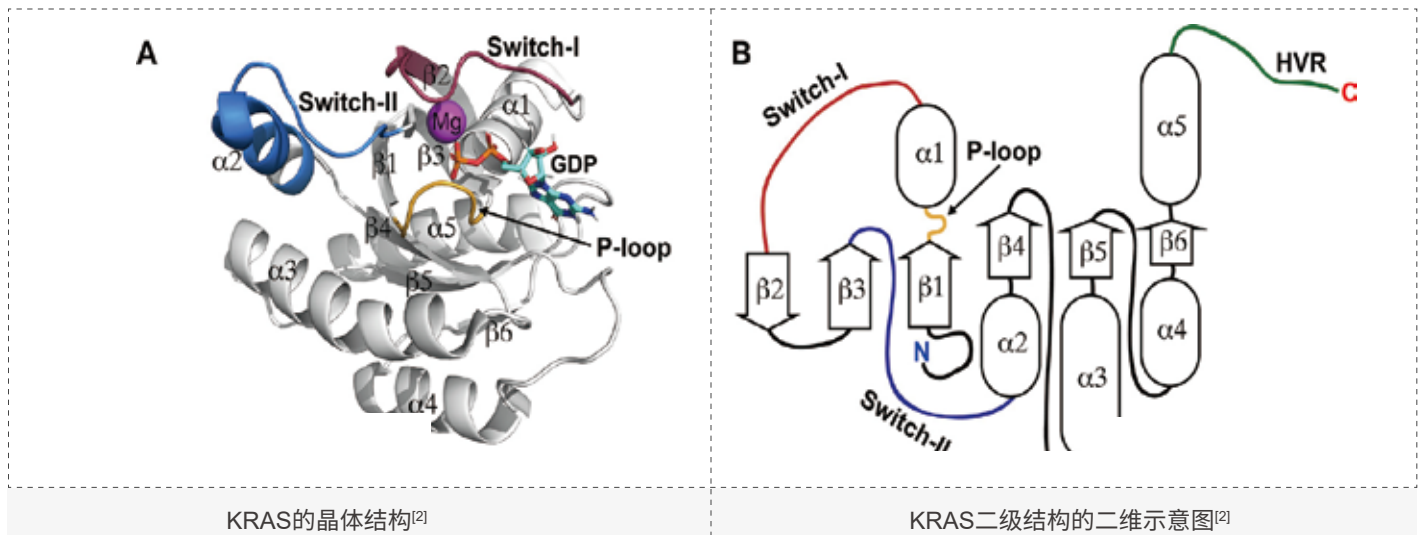
KRAS蛋白作为分子开关,在GDP结合的无活性状态和GTP结合的活性状态之间循环。KRAS蛋白分别通过与GTP和GDP结合,在无活性形式和活性形式之间转换。

虽然KRAS蛋白具有内在的核苷酸交换和GTP水解,但其细胞信号传导状态是由鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEFs)激活引起的,如催化GTP结合的SOS(son of sevenless)和Ras鸟嘌呤核苷酸释放蛋白,以及GTPase激活蛋白(GAPs)催化的去激活作用,如刺激GTP水解的p120GAP和神经纤维蛋白(NF1)。



KRAS 结构

KRAS蛋白包含四个结构域。在三种RAS亚型中,N端的第一个结构域是相同的,第二个结构域的序列相似性相对较低。这两个区域对KRAS蛋白的信号功能都很重要,并共同形成了G-结构域。KRAS蛋白分子量为21 kDa,由6条 β -折叠链(形成蛋白核心)和5条 α 螺旋结构组成,形成两个主要结构域:G结构域和C端结构域。KRAS的G结构域由残基1-166组成,包括GTP结合口袋,该区域对于下游效应物和GTPase激活蛋白(GAPs)之间的相互作用至关重要。G结构域是高度保守的,包含负责GDP-GTP交换的switch I和switch II区域。C端是一个包含CAAX (C=半胱氨酸,A=任意脂肪氨基酸,X=任意氨基酸)基序的高变区,引导翻译后修饰并决定细胞膜锚定。该区域在RAS蛋白的生物活性调控中起着重要作用。



KRAS的晶体结构^[2]

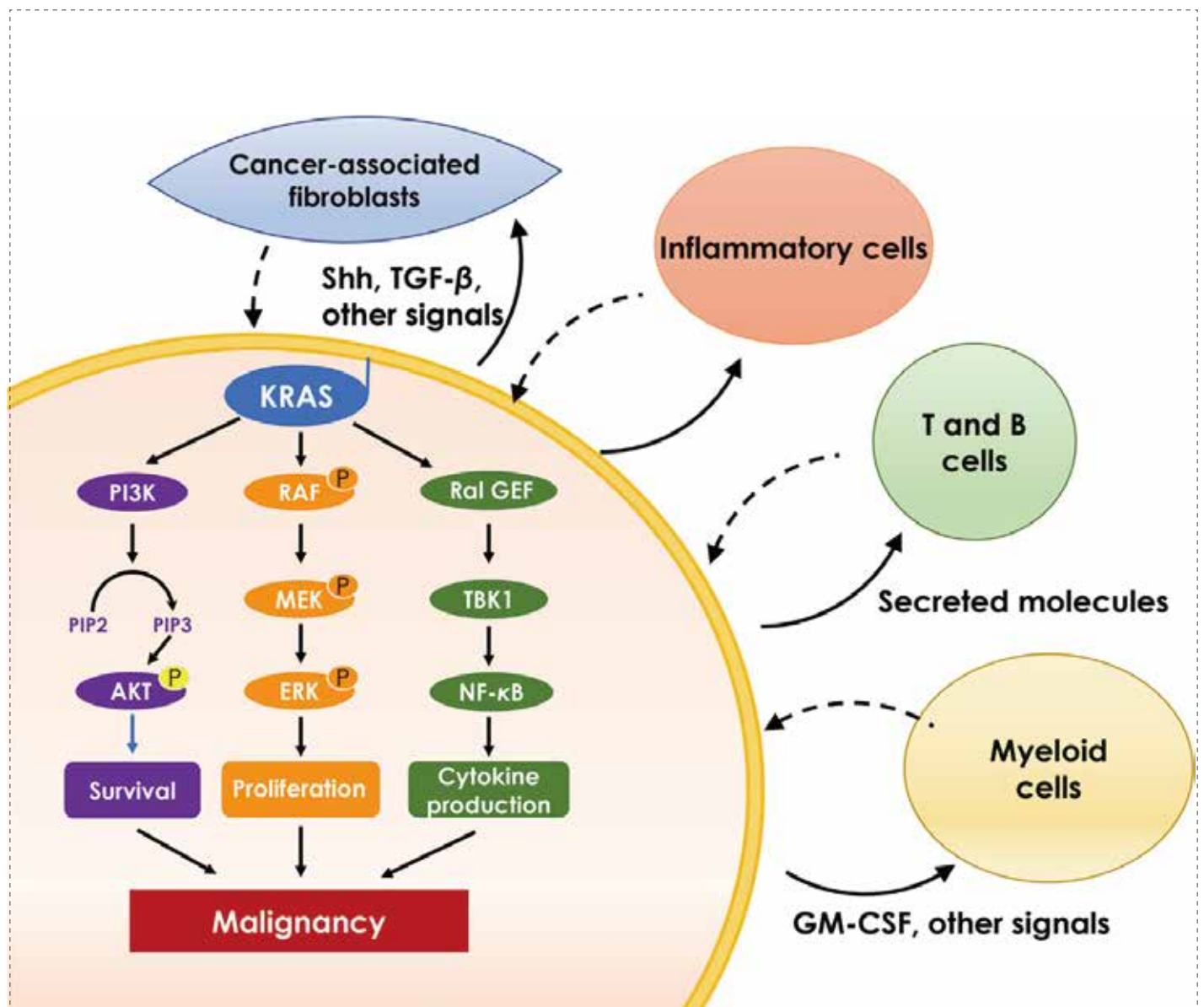
KRAS二级结构的二维示意图^[2]

KRAS 信号通路

KRAS是激活一系列信号分子的上游信号传感器之一，能够转导信号从细胞表面传递到细胞核，并调控一系列基本的细胞过程，如细胞分化、生长、趋化和凋亡。除了上述GTP/GDP结合外，KRAS信号的激活现在被认为是一个多步骤的过程，需要适当的KRAS翻译后修饰、细胞膜定位和与效应蛋白的相互作用。

KRAS蛋白的信号转导并不只发生在细胞膜上。KRAS对下游信号通路的激活也可以由亚细胞区域(如内质网和高尔基体)的信号触发。

在细胞外刺激作用下，从失活的RAS-GDP到激活的RAS-GTP的转化进一步促进了多种信号通路的激活，包括MAPK通路、PI3K通路和Ral-GEFs通路，其中以MAPK通路的特征最为明显。已知RAS-GTP直接与RAF蛋白结合，将RAF激酶家族从细胞质招募到膜上，在细胞膜上二聚化并活化。激活的RAF随后对其下游底物，即MEK和ERK进行一系列磷酸化反应，并传导生长信号。



主要的KRAS效应通路^[1]

KRAS 蛋白的结晶研究

♥ 高通量结晶筛选

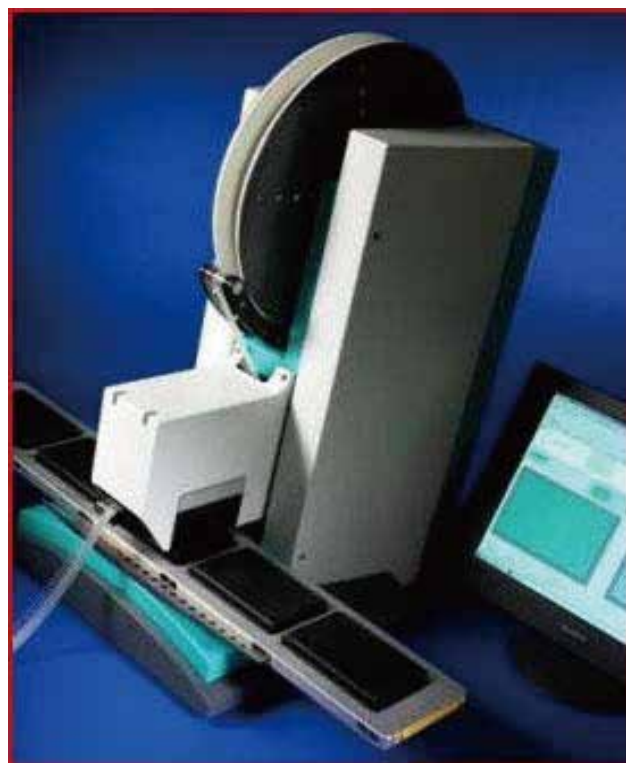
1000+筛选条件



Hampton research HT Kits



QIAGEN HT Classics Suite



Mosquito

♥ 上海同步辐射光源 (Shanghai Synchrotron Radiation Facility; SSRF)

美迪西参与了上海光源的设计、建设和管理,这是一个用于大分子晶体学的工业光束线站,大分子光束线于2009年7月开通。

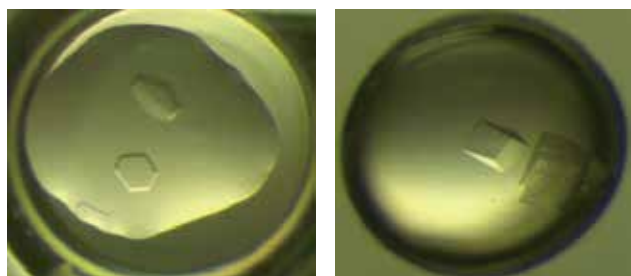


工业用大分子晶体学线站

- 卓越的光束线和服务
- 更低的成本
- 3.5 GeV存储环
- 全年运营
- 紧邻张江高科技园区和浦东机场

研究案例

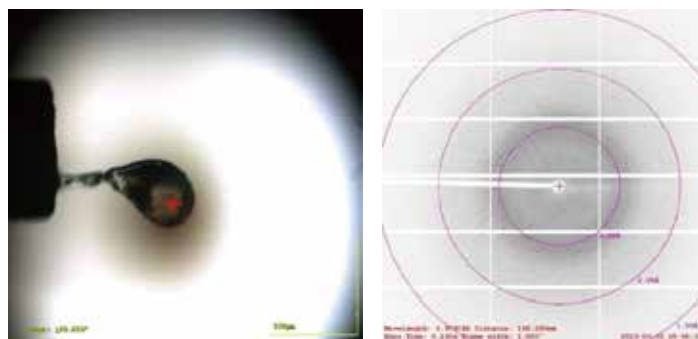
KRAS-G12D



0.17 M 醋酸铵
0.085 M 醋酸钠 pH 4.6
15% (v/v) 甘油
25.5% (w/v) PEG 4000

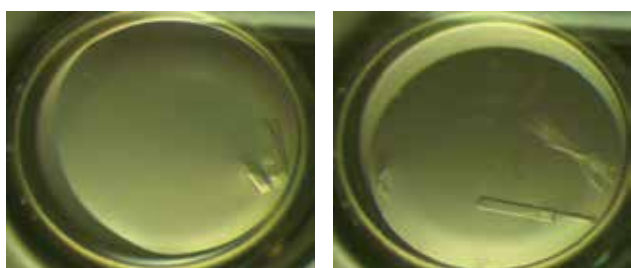
0.2 M 硫酸锂
0.1 M Tris-HCl pH 8.5
30% (w/v) PEG 4000

KRAS^{G12D}的筛选



KRAS^{G12D}的X射线衍射数据

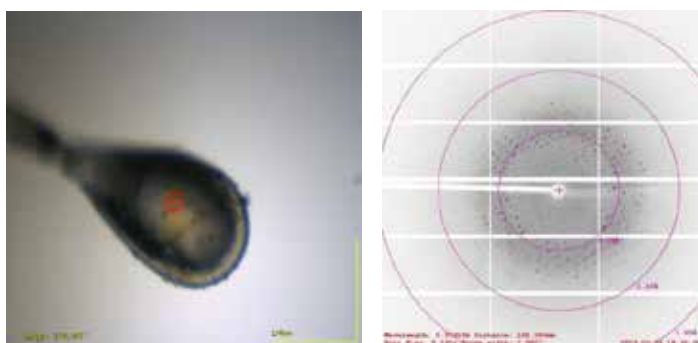
KRAS-G12D with MRTX1133



0.17 M 醋酸铵
15% (v/v) 甘油
25.5% (w/v) PEG 4000

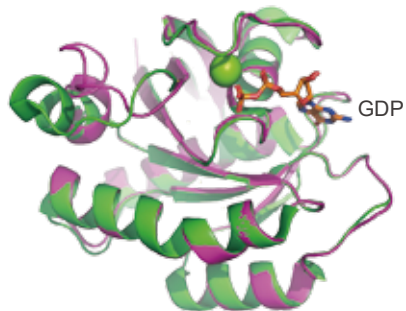
0.2 M 醋酸铵
0.1 M 醋酸钠 pH 4.6
25% (w/v) PEG 4000

共晶的筛选



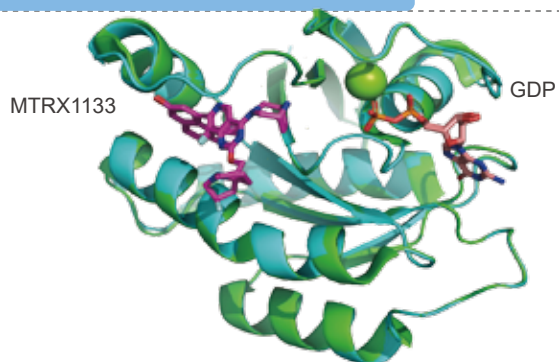
共晶的X射线衍射数据

KRAS-G12D



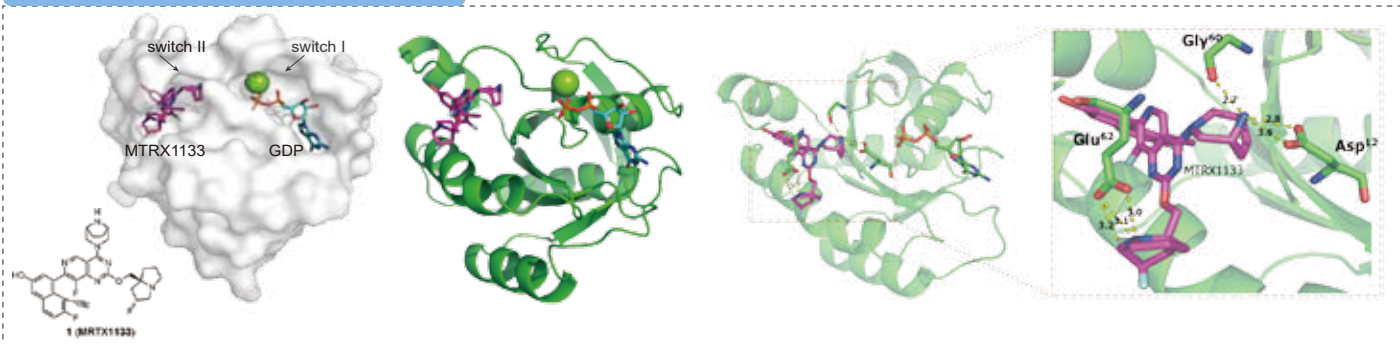
KRAS^{G12D}与7RPZ的结构比较,绿色为PDB ID 7RPZ,粉色为美迪西的数据。这些数据关联性非常强。

KRAS-G12D with MRTX1133



KRAS^{G12D}与MRTX1133的共结晶结构(7RPZ, PDB)比较,绿色结构为PDB ID 7RPZ,青色为美迪西的数据。这些数据关联性非常强。

KRAS-G12D with MRTX1133



与GDP结合的KRAS^{G12D}与MRTX1133的共晶结构

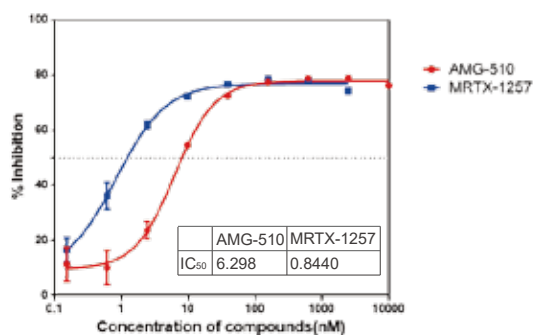
KRAS 靶向药物的体外研究

在研究和开发的初始阶段, 体外功能分析对候选KRAS靶向药物的实际评估至关重要。这些分析为验证KRAS靶向药物活性提供了科学依据, 并提供了支持治疗效果的初步证据。因此, 它们在KRAS靶向候选药物选择的决策过程中起着关键作用。

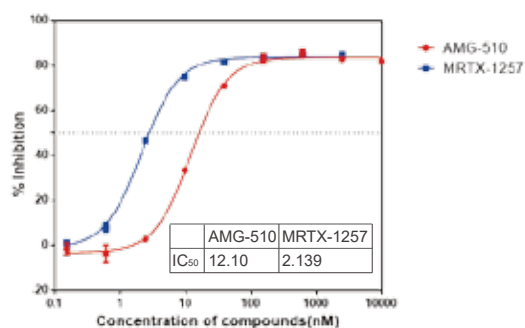
♥ KRAS细胞试验

美迪西已经验证了KRAS突变细胞系的细胞毒性测试方法, 2D和3D试验均可用于KRAS抑制剂的评估。

IC₅₀ screening of test compounds against NCI-H358



IC₅₀ screening of test compounds against MIA PACA-2



Cell lines	Tissue	KRAS Mutant
AsPC-1	pancreas	G12D
Capan-1	pancreas	G12V
Capan-2	pancreas	G12V
CFPAC-1	pancreas	G12V
HPAF-II	pancreas	G12D
MIAPaCa-2	pancreas	G12C
Panc 10.05	pancreas	G12D
SU.86.86	pancreas	G12D
HCT116	large_intestine	G13D
HCT15	large_intestine	G13D
LoVo	large_intestine	G13D
T84	large_intestine	G13D
Calu-1	lung	G12C
NCI-H2122	lung	G12C
NCI-H23	lung	G12C
NCI-H358	lung	G12C
NCI-H441	lung	G12V
SW1463	large_intestine	G12C
SW480	large_intestine	G12V
SW620	large_intestine	G12V
SW837	large_intestine	G12C

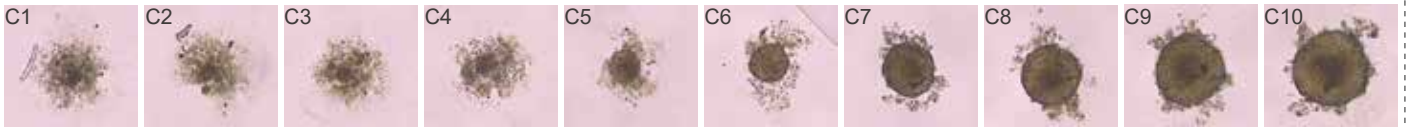
通过CellTiter-Glo检测2D细胞增殖试验

细胞毒性试验(3D)

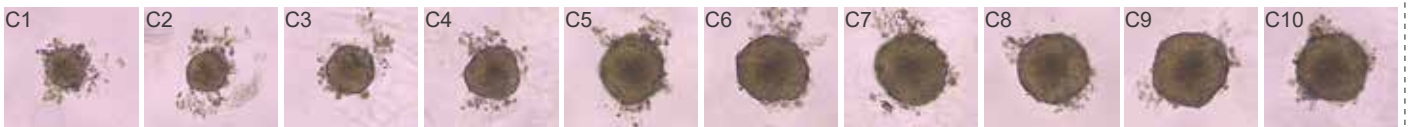
NCI-H358 (Lung, KRAS^{G12C}) Cell Cytotoxicity Assay (3D)

Group	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Concentration (nM)	1000	333.3	111.1	37.04	12.35	4.115	1.372	0.457	0.152	0

Compound	Cell line	Incubation time (Day)	Start conc	Dilution fold
AMG510	NCI-H358	12	1 μ M	3-fold diluted

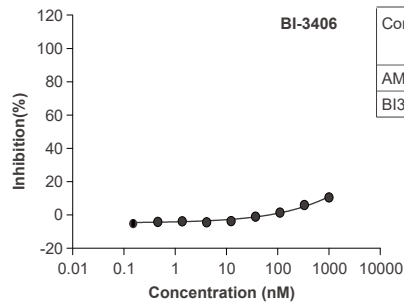
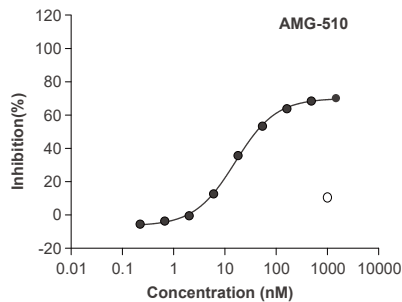


Compound	Cell line	Incubation time (Day)	Start conc	Dilution fold
BI3406	NCI-H358	12	1 μ M	3-fold diluted



以1 μ M起始浓度、按1:3连续稀释的药物处理NCI-H358细胞288 h后, 显微镜检测细胞毒性结果。

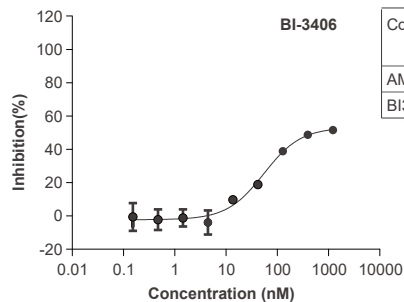
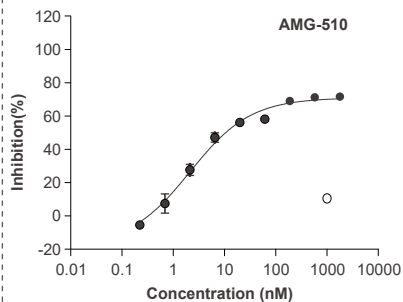
NCI-H358 (Lung, KRAS^{G12C}) Cell Cytotoxicity CTG Assay (2D; 3 days)



Compound	CTG-IC ₅₀ S on NCI-H358 cells (nM)	Top Inhibition(%)	Start conc	Dilution fold
AMG510	10.89	86.86	1 μ M	3-fold diluted
BI3406	>1000	13.78	1 μ M	3-fold diluted

以1 μ M起始浓度、1:3连续稀释的药物处理NCI-H358细胞72 h后, CTG测定细胞毒性。

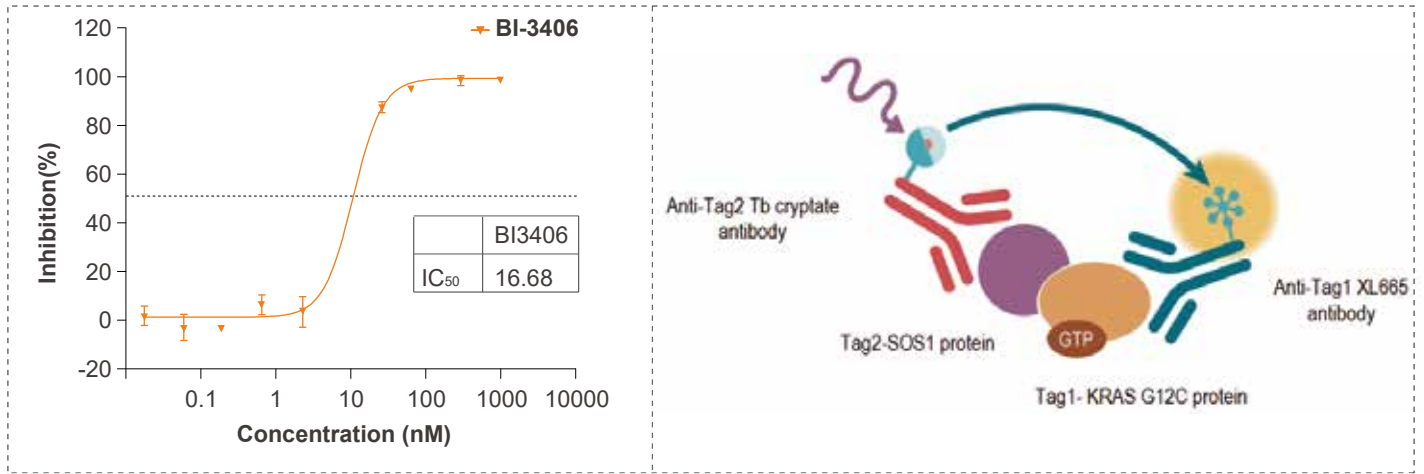
NCI-H358 (Lung, KRAS^{G12C}) Cell Cytotoxicity CTG Assay (3D; 12 days)



Compound	CTG-IC ₅₀ S on NCI-H358 cells (nM)	Top Inhibition(%)	Start conc	Dilution fold
AMG510	1.386	99.52	1 μ M	3-fold diluted
BI3406	48.23	71.53	1 μ M	3-fold diluted

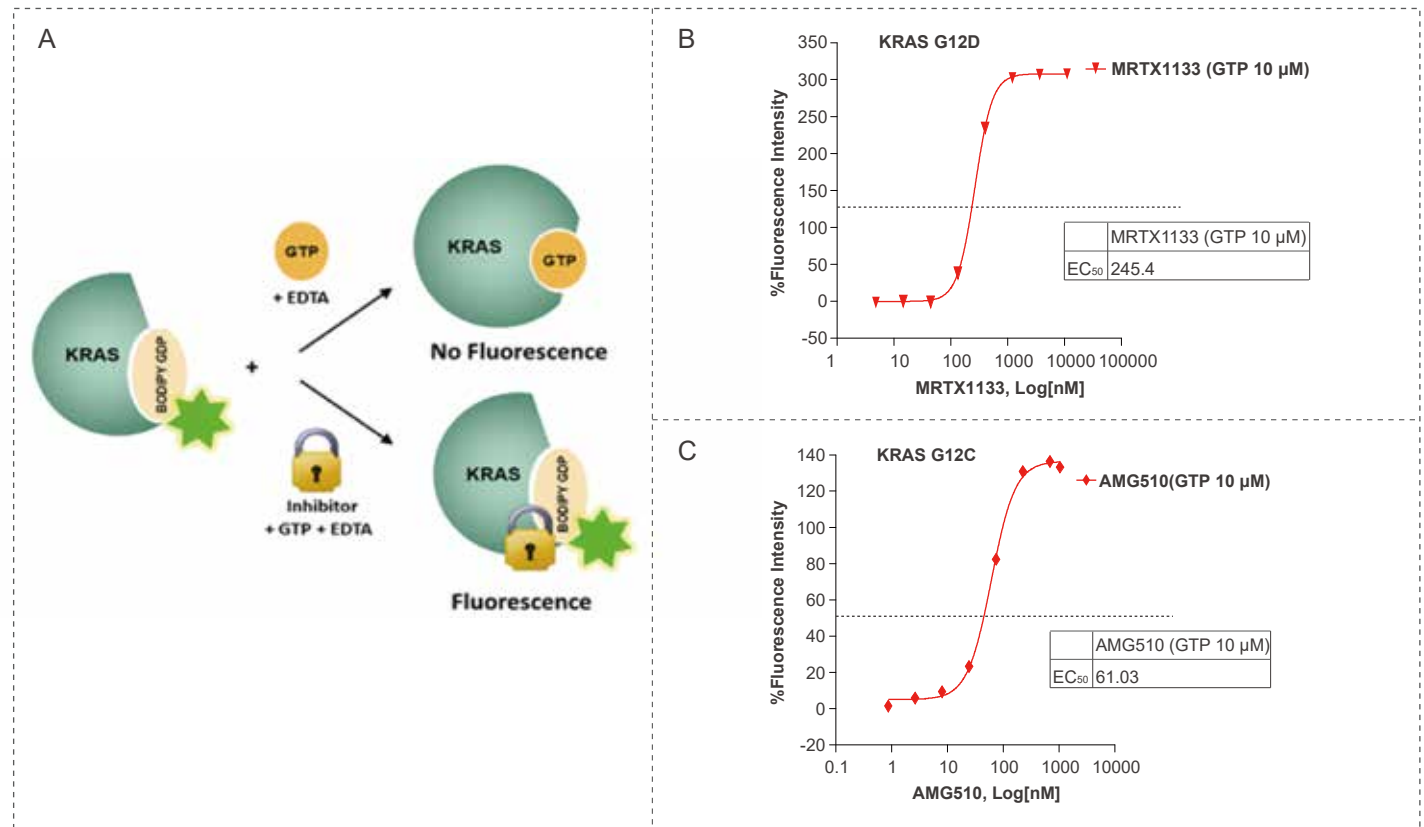
以1 μ M起始浓度、1:3连续稀释的药物处理NCI-H358细胞288 h后, 显微镜测定细胞毒性。

基于蛋白的生化活性试验



Kras G12C-SOS1结合的IC₅₀活性测试筛选试验化合物

鸟嘌呤核苷酸交换试验



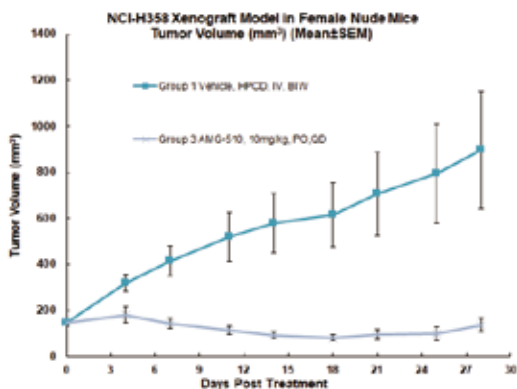
- KRAS在含有1mM BODIPY FL-GDP, 20 mM HEPES pH 7.6, 10 mM EDTA, 20 mM硫酸铵和1 mM DTT的溶液中, 在4°C下孵育48小时。
- 用20 mM MgCl₂溶液停止反应。
- 将含有KRAS蛋白的BODIPY-FL-GDP浓缩去除BODIPY-FL-GDP。
- 图A: 试验方法的MoA

KRAS靶向药物的药理药效学研究

♥ KRAS突变-CDX模型

Cancer Type	Cell Lines	Cancer Type	Cell Lines
KRAS G12C	MIA PaCa-2, NCI-H358, UM-UC-3, Calu-1	KRAS G12V	SW480, CAPAN-1, NCI-H727
KRAS G12D	GP2D, SW1990, AsPC-1	KRAS G13D	LoVo, HCT-116, HT15

Medicilon Case: CDX - KRAS Mutation (G12C)



- **Animals:**
Female BALB/c Nude mice
- **Cells:**
NCI-H358
- **Model Establishment:**
Right flank, SC

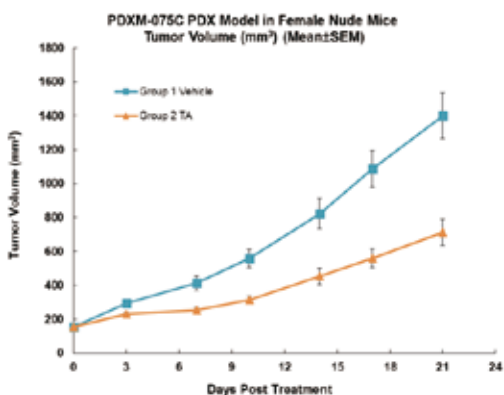
♥ PDX重要突变/过表达/耐药模型

GENE	PDX ID	GENE	PDX ID
KRAS Mutation	PDXM-060C (p.G12V), PDXM-069C (p.G12V), PDXM-075C (p.G12D), PDXM-076C (p.G13D), PDXM-212Li (p.G12D)	BCR-ABL Fusion	PDXM-242Le
TP53 Mutation	PDXM-060C (p.R273H), PDXM-072C(p.Y234H)	ERBB2 Overexpression	PDXM-069C, PDXM-016C, PDXM-060C, PDXM-087C, PDXM-104C...
PIK3CA Mutation	PDXM-075C (p.H1047L), PDXM-092Ga (p.E545G)

Resistance*	PDX ID	Resistance*	PDX ID
Docetaxel + Cisplatin	PDXM-271O (Ovarian cancer)	Radiation	PDXM-311(H&N)
VDLP + MA + CVAD	PDXM-293Le (Leukemia)

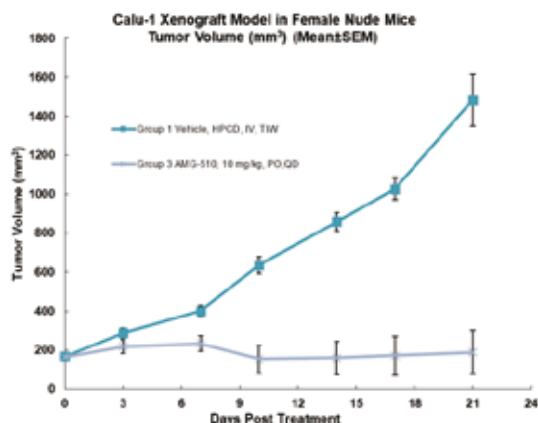
* note: these resistance models are not related to KRAS mutation

Medicilon Case: PDX -- KRAS Mutation (G12D)

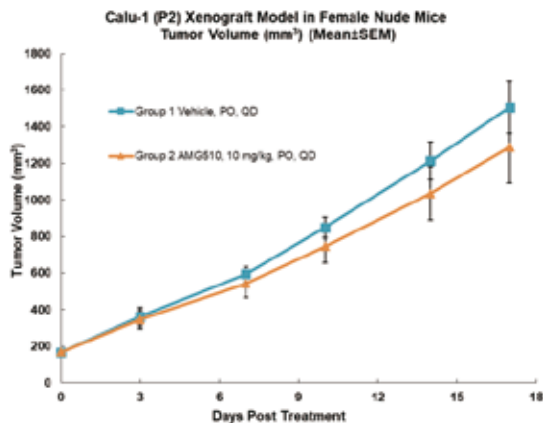


- **Animals:**
Female BALB/c Nude mice
- **Tissue:**
PDX Colon Cancer
- **Model Establishment:**
Right flank SC Trocar

Medicilon Case: AMG-510 Resistant Model - Calu-1 (G12C)



野生型肺癌模型



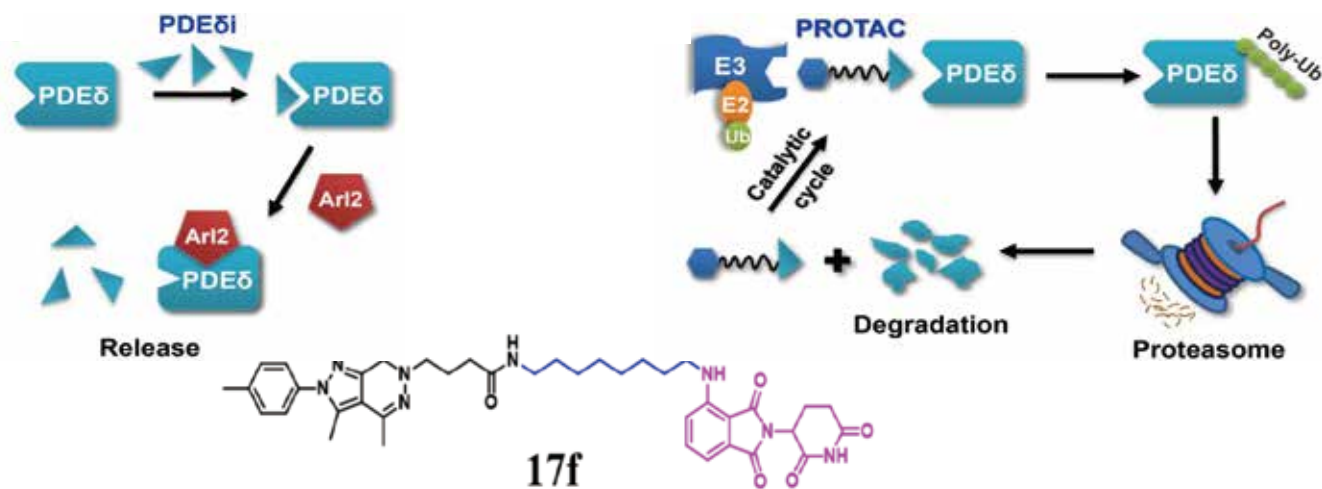
耐药肺癌模型(通过体内治疗2个周期(P2)建立, 每个周期2个月。这里展示的是P3结果。)

KRAS靶向药物的药代动力学研究

美迪西为KRAS靶向药物PK研究的关键参数提供高质量的定量分析, 结果准确。

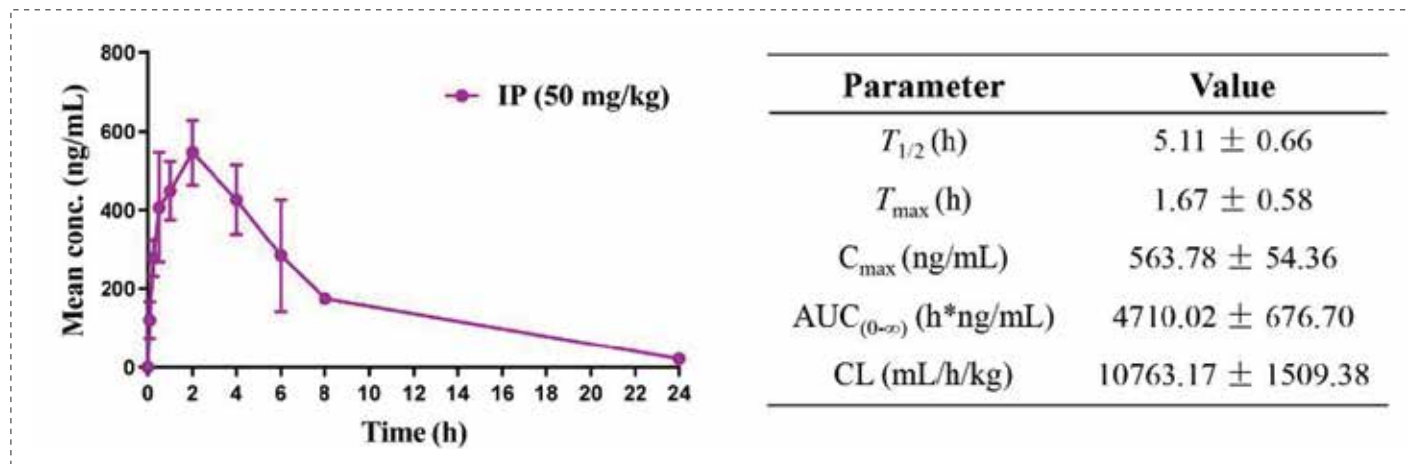
美迪西案例: KRAS-PDEδ抑制剂的药代动力学

KRAS-PDEδ蛋白-蛋白相互作用是癌症治疗的一个极具吸引力的靶点。设计并合成了一系列高效的PROTAC PDEδ降解剂。最有潜力的Compound 17f是治疗KRAS突变型结直肠癌的PROTAC PDEδ降解剂。Compound 17f为KRAS-PDEδ相互作用的成药性研究提供了新的化学工具或先导化合物。Compound 17f在SW480结直肠癌异种移植模型中具有显著的抑制肿瘤生长作用。这项验证研究为靶向KRAS-PDEδ相互作用的成药性提供了新的策略, 并为治疗KRAS突变型癌症提供了有效的先导化合物。



PROTAC策略和KRAS-PDEδ抑制剂Compound 17f^[3]

采用Sprague-Dawley (SD)大鼠进行Compound 17f的药代动力学研究。在剂量为50 mg/kg下腹腔注射给药后,分析Compound 17f在血浆中的浓度。这些试验由美迪西进行。Compound 17f的半衰期约为5.1 h,峰值浓度 C_{max} 为564 ng/mL。虽然Compound 17f的分子量较大(MW=723),但能在大鼠体内有效吸收并达到足够的血浆暴露量,其曲线下面积(AUC)值为4710 h·ng/mL。



Compound 17f在大鼠体内的PK参数^[3]

美迪西助力KRAS项目举例

XNW14010

2022年5月, NMPA批准了信诺维抗肿瘤1类新药XNW14010的临床申请, 拟用于治疗伴有KRAS G12C突变的晚期实体瘤。XNW14010是一种高选择性的小分子KRAS^{G12C}蛋白共价结合抑制剂。临床前实验数据显示XNW14010在不同的肿瘤模型中均有良好的抗肿瘤活性, 且呈现良好的量效关系, 并具有良好的经口给药药代动力学特征和较为理想的安全窗口。

美迪西作为信诺维的合作伙伴, 为XNW14010的研发提供了(包括药代和安全性评价在内)综合性临床前研究服务, 为项目获批临床提供了有力支撑。

参考文献:

- [1] Pingyu Liu, et al. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2019 Sep;9(5):871-879. doi: 10.1016/j.apsb.2019.03.002.
- [2] Tatu Pantsar. The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. Comput Struct Biotechnol J. 2019 Dec 26;18:189-198. doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.004.
- [3] Junfei Cheng, et al. Discovery of Novel PDEδ Degradors for the Treatment of KRAS Mutant Colorectal Cancer. J Med Chem. 2020 Jul 23;63(14):7892-7905. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00929.
- [4] Gongmin Zhu, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. Mol Cancer. 2021 Nov 6;20(1):143. doi: 10.1186/s12943-021-01441-4.
- [5] Tamas Yelland, et al. Stabilization of the RAS:PDE6D Complex Is a Novel Strategy to Inhibit RAS Signaling. J Med Chem. 2022 Feb 10;65(3):1898-1914. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01265.
- [6] Timothy H Tran, et al. KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF activation. Nat Commun. 2021 Feb 19;12(1):1176. doi: 10.1038/s41467-021-21422-x.



上海美迪西生物医药股份有限公司

地址: 上海市浦东新区川大路585号 电子邮箱: marketing@medilcon.com.cn

电话: +86 (21) 5859-1500 服务热线: 400-780-8018 网址: www.medilcon.com.cn