

Dagmara ŁOPATKO

Katedra Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego
27, 50-370 Wrocław, Polska



Michał JEWGIŃSKI

Katedra Chemii Bioorganicznej,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27,
50-370 Wrocław, Polska

Białko KRAS– struktura, aktywność i rola w terapiach przeciwnowotworowych

KRAS protein – structure, activity and role in anticancer therapies

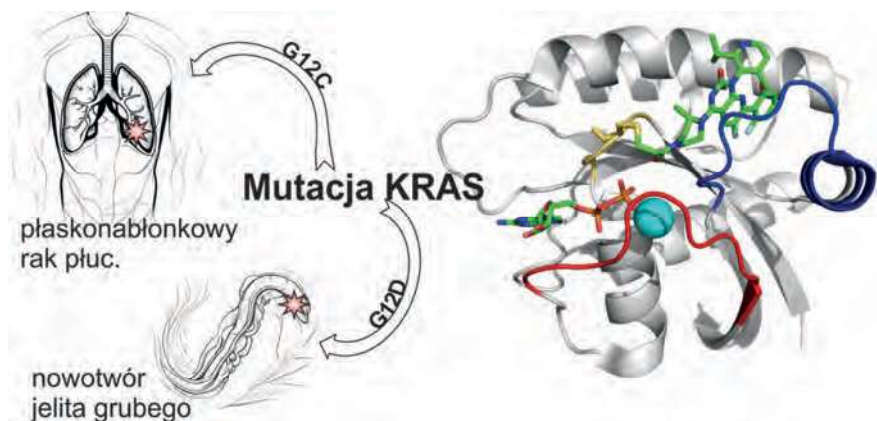
DOI: 10.15199/5.2024.1.4

Białko KRAS w formie natywnej występuje w organizmie w formie aktywnej, wiążącej GTP lub nieaktywnej, wiążącej GDP. Formy te podlegają cyklicznym, ściśle regulowanym przemianom, dzięki czemu odgrywa ono kluczową rolę w regulacji szlaków sygnalizacyjnych związanych z proliferacją i przeżywalnością komórek. Jednakże białko to jest jednym z najczęściej mutujących onkogenów rodziny białek RAS, które prowadzą do jego niekontrolowanej nadaktywności, a poszczególne jego mutacje powiązane są z licznymi formami nowotworów, które jeszcze do niedawna traktowane były jako „nieuleczalne”.

Słowa kluczowe: mutacja, nowotwór, inhibitor, przełącznik I i II;

The KRAS protein in its native form occurs in the body in an active form - binding GTP and inactive-binding GDP. These forms are subject to cyclical, tightly regulated transformations, which play a crucial role in regulating signaling pathways related to cell proliferation and survival. However, this protein is one of the most frequently mutating oncogenes of the RAS protein family, which leads to its uncontrolled hyperactivity, and its mutations are associated with numerous forms of cancer that until recently were considered as “incurable”.

Keywords: mutation, cancer, inhibitor, switch I and II



Wstęp

Pojęcie „nieuleczalny” definiuje cele molekularne, które chemiczne i farmakologiczne są obecnie nieosiągalne, a istniejące dane naukowe świadczą o tym, że opracowanie molekuly wobec takiego celu byłoby istotne klinicznie. Postęp technologiczny pozwala na przezwyciężenie problemu nieuleczalności, zatem bardziej stosowny termin stanowi „trudne do leczenia”. Do tej grupy należą cele molekularne, krytyczne dla inicjacji i progresji chorób nowotworowych, w tym onkogenne białka RAS, których mutacje stwierdza się statystycznie w blisko 30% ludzkich nowotworów [1]. Mutacje wpływające na ekspresję i funkcje genów odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie komórek uchodzą za główną przyczynę transformacji nowotworowej. Globalna zapadalność na choroby nowotworowe ulega ciągłej progresji. Szacuje się że w 2040 r. obciążenie genetyczne nowotworami sięgnie 28,4 mln przypadków co stanowi 47-proc. przyrost względem 2020 r. [2]. Molekularne badania kancerogenezy mają na celu identyfikację mutacji aktywujących, zrozumienie ich roli

w kancerogenezie oraz opracowanie względem nich skutecznych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

Odkrycie w 1982 r. mutacji genetycznych wirusa mięsaka szczura RAS (*Rat sarkoma virus*) w komórkach ludzkiego raka dało początek serii badań nad strukturą i biochemią białek Ras [3]. Mutacje w genach kodujących białka RAS są diagnozowane w różnych sytuacjach klinicznych, począwszy od mutacji somatycznych w chorobach nowotworowych, poprzez mutacje germinalne w zaburzeniach rozwoju określanych mianem „RASopatii”, aż po zespoły malformacji naczyniowych i przerostu.

Podrodzina Ras składa się z 4 białek (KRAS4a, KRAS4b, HRAS i NRAS), które wykazują znaczną homologię sekwencji oprócz hiperzmiennego regionu końca C [4]. Białka Ras cyklicznie przełączają się między konformacją aktywną związaną z trifosforanem guanozyny (GTP) i nieaktywną związaną z difosforanem guanozyny (GDP) za pośrednictwem czynników wymiany nukleotydów guaninowych (GEF) i białek aktywujących GTPazę (GAP).

KRAS należy do najczęściej mutujących onkogenów rodziny RAS. Mutacje KRAS są obecne w poszczególnych nowotworach złośliwych z różną częstością. Największy odsetek zachorowań dotyczy raków trzustki (>85%), raka jelita grubego (~40%), niedrobnokomórkowego raka płuc NSCLC (~30%) i raka dróg żółciowych (~20%) [5]. Zdecydowana większość mutacji KRAS to pojedyncze mutacje typu „missense”, występujące najczęściej w kodonach 12, 13 i 61. Te onkogenne mutacje prowadzą do zmiany powierzchni konformacyjnej KRAS wiążącej GAP powodując zahamowanie hydrolizy GTP zależnej od GAP, jak również zmniejszenie tempa wewnętrznej hydrolizy GTP co zapobiega dezaktywacji KRAS [6]. W rezultacie zmutowany stale aktywny KRAS przekazuje konstytutywne sygnały do jądra za pośrednictwem szlaków sygnałowych MAPK, PI3K, RalGDS, promując w ten sposób nadmierną proliferację komórek.

Od ponad 4 dekad mutacje KRAS uchodziły za „nieuleczalne”. Projektowanie małowzrostkowych inhibitorów odwracalnych konkurujących o miejsce wiązania KRAS z GTP stanowi wyzwanie ze względu na wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie GTP/GDP, ich pikomolarne powinowactwo do KRAS oraz brak dobrze identyfikowalnych kieszeni wiążących na powierzchni onkoproteiny [7]. Z uwagi na trudności w projektowaniu strategii nukleotydu- i kompetycyjnych ukierunkowanych bezpośrednio na KRAS, skupiono się na inhibicji allosterycznej i kowalencyjnej osiągając pierwszy pozytywny efekt w 2013 r. dla mutacji G12C [8]. Lata badań nad opracowaniem skutecznych terapii celujących w KRAS przyniosły w 2021 r. sukces kliniczny wraz z zatwierdzeniem przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) i Europejską Agencję Leków (EMA) Sotorasibu (AMG510, Lumakras™) oraz następnie w 2022 r. przez FDA Adagrasibu (MRTX849) - pierwszych inhibitorów mutacji KRAS^{G12C} jako terapii dla dorosłych pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NSCLC) [9]. Oprócz inhibitorów kowalencyjnych ukierunkowanych na mutację G12C, w trakcie badań znajdują się strategie terapeutyczne oparte na inhibicji odwracalnej, systemie degradacji proteosomalnej PROTACs, terapii komórkowej, siRNA, inhibitorach peptydowych oraz szczepionkach przeciwnowotworowych. Badania i rozwój obejmują ukierunkowanie terapeutyczne na mutacje G12D, G12V, G12S, G12A, G12R, G13C, G13D, Q61H. To sprawia, że poszukiwanie i rozwój nowych cząsteczek celujących i metod terapii przeciwnowotworowej dla mutacji KRAS nadal należy do kluczowych wyzwań badawczych, wraz z trudnościami związanymi ze zrozumieniem heterogeniczności nowotworów oraz mechanizmów wrażliwości i oporności na leki [1].

Struktura białka KRAS

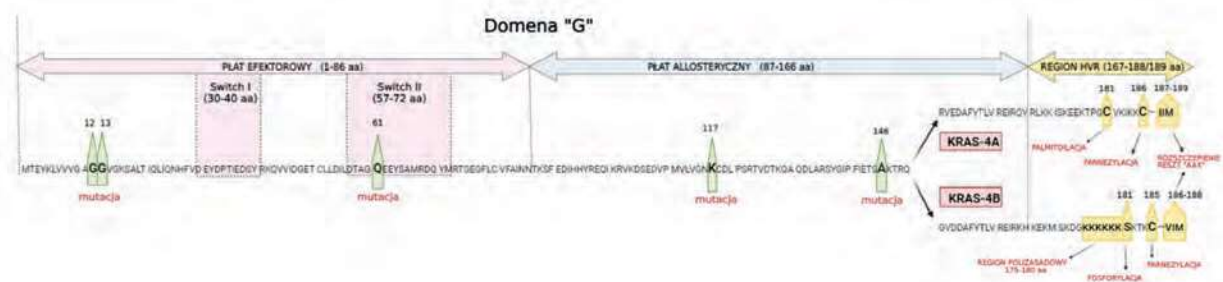
Gen KRAS należy do podrodziny onkogenów wirusa mięsaka szczura (RAS). Trzy geny: KRAS, NRAS i HRAS kodują cztery białka

podrodziny RAS (KRAS4A, KRAS4B, NRAS, HRAS) bardzo podobne pod względem sekwencji pierwotnej (82–90% identyczności sekwencji aminokwasów, struktury i właściwości biochemicznych) [10]. Gen KRAS zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 12, w p12.1, i składa się z sześciu eksonów, przy czym pierwszy ekson stanowi obszar nieulegający translacji UTR, natomiast pozostałe 5 eksonów (1,2,3,4A i 4B) to eksony kodujące. Wobec tego, że gen zawiera dwie alternatywne formy: 4A i 4B, transkrypt KRAS ulega alternatywnemu składaniu, dając początek dwóm izoformom białkowym: KRAS-4A i KRAS-4B, które składają się odpowiednio z 188 i 189 aminokwasów, ze względu na odmienne cięcie eksonu 4 [11]. Oba warianty splicingowe są obecne w komórkach nowotworowych i wykazują różnice w pełnionych funkcjach. Z uwagi na dominującą ekspresję mRNA kodującego KRAS-4B, w praktyce KRAS jest często rozumiany jako KRAS-4B i tym samym stanowi dokładniej przebadaną izoformę [12]. Niższe poziomy mRNA KRAS-4A wpłynęły na jego wieloletnią marginalizację w literaturze, jednakże jego ekspresja w komórkach nowotworowych została potwierdzona [13]. Mutacje o charakterze onkogennym dotyczą nukleotydów w eksonie 2 (kodon 12 i 13), 3 (kodon 59 i 61) oraz 4 (kodon 117 i 146), co oznacza, że niezależnie od tego, która izoforma ulegnie ekspresji, zarówno KRAS-4B jak i KRAS-4A dostarczy produktów białkowych o aktywności kancerogennej [3], [14].

KRAS stanowi białko błonowe o masie molekularnej 21kDa, a jego strukturę tworzą 2 domeny: konserwatywna wśród białek Ras N-końcowa domena G pełniąca funkcje katalityczne oraz domena C-końcowa określana jako region hiperzmienny HVR (*hypervariable region*) [5]. Domena G obejmuje reszty aminokwasowe 1-166 i tworzy 5 α -helis, które otaczają 6 β -harmonijek kształtujących rdzeń białka. Reszty aminokwasowe domeny G dzieli się na 2 płaty. Płat pierwszy określany mianem płata efektorowego wyróżnia trzy regiony: przełącznik-I (*switch-I*; SI), przełącznik-II (*switch-II*; SII) oraz pętlę -P (*P-loop*). Według danych zawartych w licznych pracach badawczych lokalizacja przełącznika II rozpoczyna się pomiędzy resztami 58-60, a kończy pomiędzy resztami 67-76 nie obejmując lub włączając częściowo lub całkowicie helisę $\alpha 2$ [5]. W pracy uwzględniono dane opublikowane przez grupę badawczą K. Shokata i przyjęto, że region przełącznika I i II obejmuje odpowiednio reszty 30-38 oraz 60-76 [15], natomiast pętlę P tworzą aminokwasy 10-17 [16].

Ze względu na obecność regionów przełącznikowych krytycznych dla funkcji GTP-azy, płat efektorowy stanowi subdomenę katalityczną. Obszary płata efektorowego pełnią rolę interfejsu wiążącego dla nukleotydów guaninowych oraz białek efektorowych i regulacyjnych KRas, takich jak GAP i GEF. Drugi płat to zawierający reszty aminokwasowe 87-165/166 płata allosterycznego pełniący funkcję regulacyjną [17].

KRAS może wykazywać aktywność sygnalizacyjną tylko gdy jest związany z wewnętrzną błoną plazmatyczną. Za zakotwiczenie



Rys. 1. Struktura pierwszorzędowa KRAS4A (Uniprot: P01116-1) i KRAS4B (Uniprot: P01116-2), oznaczenie najliczniej mutujących reszt aminokwasowych, oznaczenie reszt ulegających modyfikacjom potranslacyjnym oraz schematyczny podział sekwencji na regiony funkcjonalne

KRAS do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej odpowiada domena C określana jako region hiperzmienny HVR (*hypervariable region*). Domena obejmuje reszty aminokwasowe od 167 do 188 dla Kras-4A i 189 dla Kras-4B oraz charakteryzuje się wysokim stopniem zmienności. Cztery ostatnie reszty aminokwasowe domeny C stanowią tzw. motyw CAAX (cysteina, 2 aminokwasy alifatyczne, inna reszta). Modyfikacje potranslacyjne reszt C-terminalnych takie jak prenylacja, rozszczepienie reszt AAX, estryfikacja i palmitoilacja warunkują lokalizację w błonie [18]. Modyfikacje sprawiają, że globularne białko o charakterze hydrofilowym ulega przemianowi w białko błonowe zakończone hydrofobowym C-końcowym estrem metylowym cysteiny farnezyli, który łącznie z regionem polilizynowym w przypadku KRAS 4A odpowiada za zakotwiczenie białka w fosfolipidowej błonie plazmatycznej [19]. W zależności od poziomu ekspresji, białka KRAS związane z GTP za pośrednictwem C-końcowego regionu HVR ulegają dimeryzacji lub tworzą klastry wyższych rzędów (z 5-8 monomerów) na wewnętrznej błonie komórkowej w celu sygnalizacji komórkowej [20]. Związane z błoną białko może również zostać wyparte przez fosfodiesterazę (PDE) δ [21].

Charakterystyka powierzchni wiążących KRAS

Pierwsza dogłębna analiza wszystkich dostępnych miejsc wiążących białka KRAS została przeprowadzona przez Zhao i współpracowników [22]. Zgodnie z ich badaniami wyróżnia się trzy klasy kieszeni wiążących ligandy na powierzchni KRAS. Wykazują one specyficzną elastyczność umożliwiając przyłączenie różnorodnych potencjalnych ligandów.

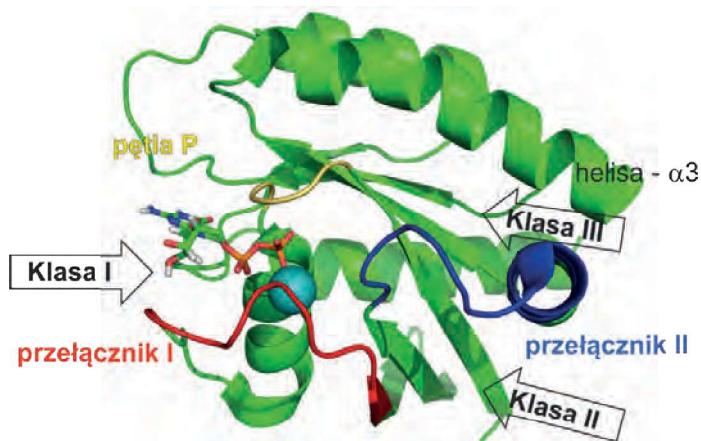
Klasa I (miejsce wiązania nukleotydów) stanowi konserwatywną kieszeń zachowaną do wiązania ligandów stanowiących GTP, GDP i ich analogów z wysokim powinowactwem. Strukturą rdzenia liganda musi być nukleotyd. Związany ligand GTP lokuje się tak, że jego skrajna grupa γ -fosforanowa znajduje się w sąsiedztwie pętli P i Przełącznika-II. Kieszeń klasy I tworzą reszty aminokwasowe strukturalnie zlokalizowane w regionie Pętli P, przełącznika I, przełącznika II i płata allosterycznego. Do reszt warunkujących silne wiązania ligandów z KRAS zalicza się Gly13, Gly15, Lys16, Ser17, Ala18, Lys117, Phe28, Asp119, Ala146 i Lys147, natomiast resztami mniej zaangażowanymi są Cys12, Val14, Val29, Asp30, Glu31, Tyr32, Asp33, Thr35, Gly60, Gln61, Asn116, Lys117 i Ser145.

Klasa II (kieszeń przełącznika -I/II) ma postać płytkiej kieszeni nieznacznej wielkości na powierzchni KRAS, która pośredniczy w interakcji białko-białko. Po związaniu ligandów regiony przełącznikowe I i II ulegają wyraźnym modyfikacjom celem dostosowania się do struktury ligandów, wskazując na potencjalny efekt allosteryczny miejsca. Jednakże gdy GDP, warunkujące nieaktywną formę białka Kras zajmuje kieszeń wiązania nukleotydów klasy I, Kieszeń klasy II nie wykazuje wyraźnych zmian konformacji. Rdzeń stanowią położone w regionach β 1-3 i przełącznik-II reszty Lys5, Val7, Ser39, Asp54, Leu56, Gly70, Tyr71, Thr74 i Gly75, natomiast sąsiednie reszty Leu6, Glu37, Asp38, Tyr40, Arg41, Ile55 i Met67 warunkują swoiste oddziaływania umożliwiające dopasowanie do różnych ligandów. Płytką powierzchnią cechująca kieszeń wymusza silną interakcję jednej strony liganda ze strukturami β 1-3, Przełącznik-I i Przełącznik-II, przyczyniając się do tego, że jego druga strona może oddziaływać z innymi białkami.

Klasa III (kieszeń przełącznika-II/ α 3) składa się z 18 reszt aminokwasowych. 3 reszty: Val9, Ala11 i Cys12 mieszczą się w pętli P, 1 reszta: Pro34, znajduje się w regionie Przełącznika-I, natomiast 14 reszt: Thr58, Ala59, Gln61, Glu62, Tyr64, Arg68, Asp69, Met72,

Asp92, His95, Tyr96, Gln99, Ile100 i Val103 położonych jest w obrębie pętli Przełącznika-II i helisy α 3. Miejsce wiązania Przełącznika-II/ α 3 cechuje się znaczną elastycznością wiązania różnych ligandów, wykazując różne efekty allosteryczne wobec ligandów. Do klasy III należy zatwierdzony do użytku lek Sotorasib (*AMG510*) celujący w mutację G12C. Sotorasib wiąże kowalencyjnie mutację Cys12 w kieszeni allosterycznej powodując zablokowanie białka w nieaktywnym stanie.

Obszar przełącznika-II/ α 3 wykazuje największe rozmiary oraz zapewnia wysoką elastyczność pozwalającą na opracowanie cząsteczek allosterycznych o znaczeniu klinicznym dla mutacji KRAS [22].



Rys. 2. Struktura białka KRAS [PDB ID: 40BE], z zaznaczonymi pętlami P (żółta), przełącznik I (czerwona), przełącznik II (niebieska), związna cząsteczka GDP oraz jon Mg^{2+} (jasno niebieska sfera) oraz miejscami wiązania ligandów klas I-III

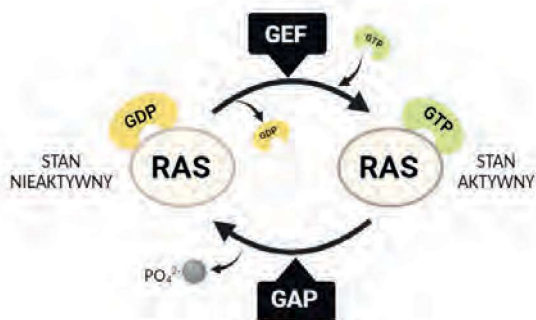
Mechanizm aktywacji i inaktywacji białka KRAS

Białko błonowe KRAS funkcjonuje jako wewnątrzkomórkowy węzeł sygnalizacyjny, który pozwala na transdukcję sygnału pochodzącego z powierzchni komórki do jądra komórkowego poprzez inicjację kaskad sygnalizacyjnych, z których kluczowe to: szlak RAF-MEK-ERK (MAPK), szlak PI3K-AKT-mTOR, szlak TIAM1-RAC i RaGDS-Ral. Kaskady te regulują krytyczne procesy komórkowe takie jak proliferacja, różnicowanie, wzrost, apoptoza, migracja, cykl komórkowy i przeżycie komórek [23], [24]. Transdukcja sygnału za pośrednictwem KRAS jest możliwa wyłącznie wtedy, gdy białko znajduje się w stanie aktywnym. Jest to związane z funkcjonowaniem GTPazyKRas jako „molekularnego przełącznika”, który przełącza się pomiędzy dwoma stanami: formą aktywną, w której związany jest trifosforanem guanozyny (GTP) i formą nieaktywną związaną z difosforanem guanozyny (GDP). Domena katalityczna białek RAS ma względnie stabilną konformację, poza dwoma regionami przełącznikowymi (przełącznik I i przełącznik II), których zmiany konformacyjne determinują interakcje z innymi białkami [25].

Forma aktywna związana z GTP charakteryzuje się ograniczoną konformacją regionów przełącznika I i przełącznika II za sprawą tzw. mechanizmu obciążonej sprężyny, wynikającego z obecności wiązań wodorowych pomiędzy atomami tlenu grupy γ -fosforanowej GTP a grupami NH Thr35 i Gly60 KRAS. Hydroliza GTP, a zarazem dezaktywacja białka do formy GDP powoduje rozerwanie wiązań przywracając elastyczność obszarom przełącznikowym [26].

KRAS wykazuje wewnętrzną aktywność GTP-azy, jednakże jest ona niska dlatego podlega regulacji i przyspieszeniu przez system

GEF/GAP (odpowiednio czynniki wymiany nukleotydów guaninowych i białka aktywujące GTPazę), który reguluje cyklizację pomiędzy nieaktywnym kompleksem KRAS-GDP i aktywnym KRAS-GTP. Czynniki wymiany nukleotydów (GEF) np. SOS1 wiążą KRAS w stanie nieaktywnym związanym z GDP katalizując jego wymianę na rzecz GTP prowadząc tym samym do aktywacji KRAS, natomiast białka aktywujące GTP-azę (GAP) np. neurofibomina1 NF1 powodują hydrolizę GTP i powrót białka do stanu nieaktywnego [27]. Utrata właściwości regulacyjnych wskutek mutacji genu prowadzi do utraty regulacji procesu prowadząc do nadmiernych podziałów [28].



Rys. 3. Schemat regulacji aktywacji i dezaktywacji białka KRAS za pomocą GEF i GAP. Opracowanie własne na podstawie [29]

Mutacje aktywujące

KRAS należy do najczęściej mutujących członków RAS i uchodzi na główny czynnik onkogenny w przypadku inicjacji nowotworu. Na Rys. 4 przedstawiono powiązanie najczęściej występujących mutacji białka KRAS z inicjowanymi przez nie nowotworami. Mutacje somatyczne w obrębie GTPazy KRAS należą do kluczowych mutacji aktywujących kancerogenezę stwierdzanych w ludzkich nowotworach i wiążą się powszechnie ze słabą odpowiedzią na standardowe terapię [6]. Mutacje te są określane jako „mutacje aktywujące” ze względu na fakt, że prowadzą zwykle do obniżenia szybkości samostnej hydrolizy GTP zapobiegają one funkcjonalnej interakcji między KRAS a białkami GAP promującymi hydrolizę GTP, podczas gdy nie zakłócają wiązania GEF i efektorów [6], [7]. Strukturalna podstawa aktywacji w przypadku pozycji Gly12 polega na tym, że zastąpienie glicyny jakąkolwiek inną resztą z wyjątkiem proliny zakłóca wiązanie GAP z KRAS poprzez zderzenia steryczne z kluczową resztą

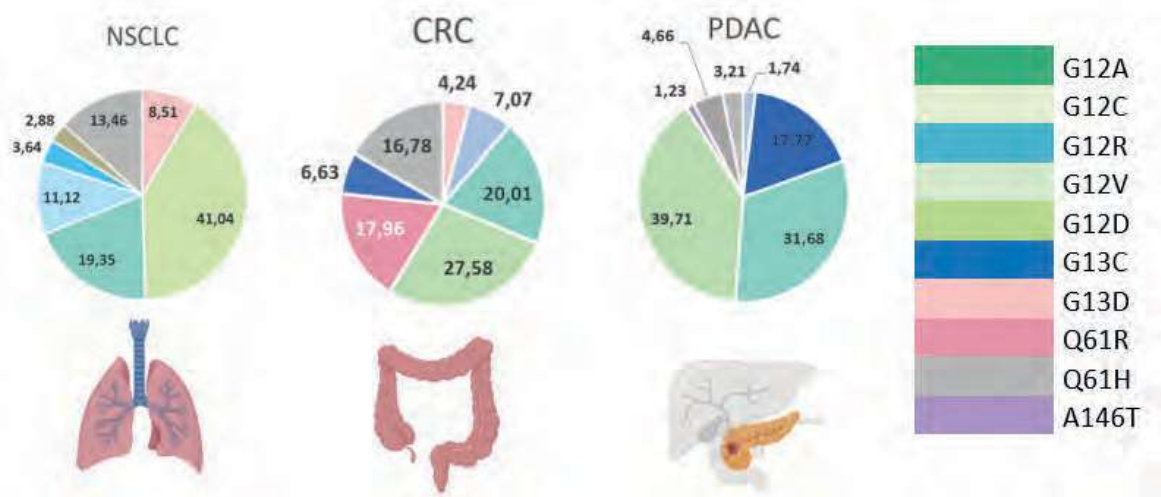
argininową GAP. W związku z tym mutacje prowadzą do akumulacji kompleksu KRAS-GTP, tym samym nadmiernie aktywując szlaki transdukcji sygnału. Kliniczne podejścia do przywrócenia normalnego funkcjonowania KRAS mają na celu przezwycięzenie akumulacji aktywnego kompleksu KRAS:GTP za pomocą różnych środków [7].

Dominują mutacje *missense* pojedynczej zasady, spośród których najpowszechniej występują mutacje kodonu 12 (Gly12), kodonu 13 (Gly13) lub kodonu 61 (Gln61). Mutacje w genie KRAS są najczęstsze w przypadku nowotworów trzustki (PDAC), jelita grubego (CRC) i płaskonabłonkowego raka płuc (NSCLC). Efekty biologiczne poszczególnych mutacji np. typ nowotworu mogą być swoiste dla tkanki lub typu komórki. NSCLC charakteryzuje się dominującą mutacją KRAS^{G12C} (glicyna → cysteina). W przypadku PDAC najczęściej dochodzi do mutacji glicyny na kwas asparaginowy (KRASG12D). Mutacje Gly12 Gln61 nie podlegają hydrolizie z udziałem GAP - neurofibrominy 1 (NF1), podczas gdy KRAS Gly13 jest częściowo podatny na jej działanie [30]. Osoby palące są bardziej narażone na zmiany mutacyjne, dlatego też palenie tytoniu zostało uznane za czynnik onkogenny. Częstość zmiany mutacyjnej może sięgnąć u nich 35% [29]. U osób niepalących mutacje KRAS również mają miejsce choć profil mutacji różni się od profilu mutacji palaczy. U osób niepalących częściej odnotowuje się mutacje KRASG12D, natomiast palaczy częściej dotyczy KRASG12C [31].

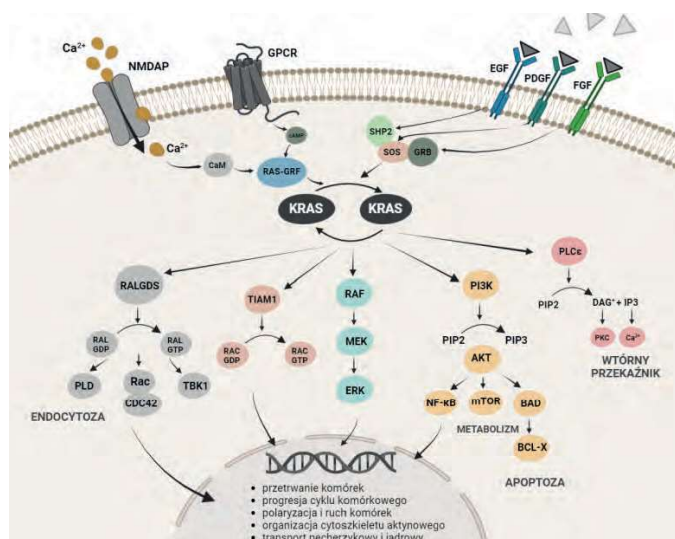
Mutacje KRAS obejmują więcej substytucji, a dane przedstawione w bazie danych CeBioportal, pozwalają zidentyfikować blisko pięćdziesiąt dodatkowych mutacji białka KRAS.

Szlaki sygnalizacyjne regulowane przez KRAS

KRAS jako ściśle regulowany przełącznik molekularny umożliwia sterowanie licznymi ścieżkami sygnałowymi przez cykliczną wymianę GTP/GDP (patrz Rys. 5). W przypadku braku mutacji, w obecności czynników wzrostu takich jak EGF, PDGF i FGF oraz chemokin i jonów Ca²⁺ wiązanie cząsteczki GTP przez KRAS powoduje strukturalne zmiany pomiędzy przełącznikiem I i przełącznikiem II i przybranie konformacji umożliwiającej interakcję z efektorami szlaków sygnalizacyjnych. W ten sposób KRAS reguluje wiele kaskad sygnalizacyjnych, w tym najważniejszy szlak RAF-MEK-ERK (kaskada kinazy białkowej aktywowanej mitogenami), który kontroluje proliferację komórkową, szlak PI3K-AKT-mTOR wpływający na przeżywalność komórek, szlak TIAM1/RAC/PAK, RalGDS/Ral oraz szlak fosfatydy-



Rys. 4. Częstość występowania najbardziej rozpowszechnionych mutacji KRAS. Opracowanie na podstawie [29]



Rys. 5. Szlaki sygnalizacyjne kontrolowane przez białko KRAS [29]

inozytolu PLCε [27]. Regulacja powyższych ścieżek przez natywne białko KRAS nie wywołuje negatywnych skutków w krajobrazie komórkowym zapewniając prawidłowe procesy wewnątrzkomórkowe.

Zmutowane białka Ras są zdolne do utrzymywania się w formie aktywnej. Zmiany punktowe np. w pozycji 12, 13 i 61 mogą prowadzić do przyspieszenia cyklu wymiany GDP/GTP, osłabiać wewnętrzną aktywność hydrolityczną, pozostawiając białko w stale aktywnej formie bądź zaburzać jego wrażliwość względem GAP i GEP. Zmutowany KRAS może przekazywać sygnały i aktywować kaskady sygnałowe bez stymulacji przez zewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu [27]. W konsekwencji, intensyfikacja kaskad sygnalizacyjnych prowadzi do nadmiernych nieplanowanych podziałów komórkowych, wpływając tym samym na nadmierne podziały komórkowe, autofagię, przeprogramowanie metaboliczne, unikanie apoptozy i niestabilność genomową [23].

Szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) stanowi kanoniczny szlak sygnalizacyjny KRAS. KRAS-GTP aktywuje RAF poprzez dimeryzację, następnie RAF oddziałuje i fosforyluje MEK1/2, który z kolei fosforyluje i aktywuje ERK1/2. Aktywność szlaku ERK jest regulowana przez ujemne sprzężenie zwrotne, np. poprzez ERK może fosforylować SOS i hamować jego aktywność i negatywnie wpływać na aktywność RAS. Finalnie ERK transportowany do jądra fosforyluje i aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF), CREB, ELK-1, ETS, NF-κB, c-Myc oraz rybosomalną kinazę S6, istotnych dla zapoczątkowania procesów kontrolujących proliferację, różnicowanie, migrację, przeżycie i śmierć komórek [32].

KRAS reguluje również szlak TIAM1 wpływający na kształt komórki, migrację, adhezję, tworzenie cytoszkieletu aktynowego, endocytozę i przemieszczanie się komórek pamięci [29]. Ponadto może również regulować szlak fosfatydyloinozytolu poprzez aktywację PLCε. PLCε jest źródłem dwóch przekazników, diacyloglicerolu (DAG) i trifosforanu inozytolu (IP3), prowadzących do zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, który kontroluje endocytozę, egzocytozę i reorganizację cytoszkieletu [26]. Szlak PI3K-AKT-mTOR jest kluczowy dla procesów podziału, różnicowania, programowana śmierć komórek, a także zdolności do transportu glukozy.

KRAS poprzez interakcję z PI3K inicjuje przekształcenie 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) w 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3). PIP3 aktywuje kinazę zależną od PDK1 (fosfoinozytolu 1) prowadząc do fosforylacji treoniny 308 białka AKT.

Kontynuacja procesu następuje pod wpływem kompleksu Mtorc2 poprzez fosforylację seryny472 prowadząc do finalnej aktywacji AKT, która transferowana do jądra komórkowego reguluje procesy rozmnażania komórek, apoptozy oraz do procesów metabolicznych [33]. AKT może aktywować białka docelowe mTOR mające znaczenie dla regulacji procesów proliferacji, przeżycia, syntezy białek, procesów metabolicznych, jednakże wykazuje zdolność fosforylacji i aktywacji białek śmierci komórkowej np. Bcl-XL/Bcl-2 (BAD) zamiast hamować procesy apoptyczne.

Strategie terapeutyczne

Od lat 80. ubiegłego wieku, wraz z odkryciem przez naukowców z firmy Merck pierwszego inhibitora proteazy wirusa HIV, projektowanie leków oparte na strukturze, ich iteracyjna synteza oraz testowanie otrzymanych analogów stanowią fundamenty procesu odkrywania leków. Mutacje w genie KRAS odgrywają kluczową rolę w różnych postaciach raka. Celowanie w te mutacje jest uważane za wielkie wyzwanie i cel terapii przeciwnowotworowej. Zwalczenie mutacji KRAS nie było wcześniej skuteczne z powodu silnego powinowactwa rzędu pikomolarnego KRAS do dużej ilości cytoplazmatycznego GTP, utrudniając inhibicję kompetycyjną oraz w odróżnieniu od innych celów molekularnych białko KRAS ma stosunkowo gładką powierzchnię bez ekspresji kieszeni wiążącej lek [5].

Na przełomie 2012 i 2013 r. ukazały się cztery przełomowe prace opisujące potencjalne małe cząsteczki wykazujące zdolność wiązania białka KRAS [22]. Strategie oparte na bezpośrednim celowaniu w mutację KRASG12C doprowadziły w 2013 r. do identyfikacji przez zespół K. Shokata nowej kieszeni allosterycznej - „S-IIP” kluczowej do opracowania kowalencyjnych, nieodwracalnych i selektywnych inhibitorów dla mutantu G12C [8]. Dzięki temu w 2021 i 2022 r. pierwsze dwa inhibitory zostały zatwierdzone przez FDA i EMA, a ich struktura stanowi źródło optymalizacji i projektowania lepszych struktur.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, rozwój potencjalnych terapii farmakologicznych obejmuje 4 zasadnicze podejścia: (i) inhibicja kowalencyjna i wzrost stężenia KRAS w kompleksie z GDP (stan nieaktywny), (ii) celowanie w interakcję RAS:SOS, aby zapobiec wymianie GDP na GTP, (iii) zakłócenie przyłączania efektorów do celu tłumienia sygnalizacji i (iv) nasilenie wiązania GAP ze zmutowanym białkiem RAS celem redukcji poziomu RAS-GTP (dotyczy przypadków, dla których wiązanie GAP jest możliwe we właściwej konformacji) [7].

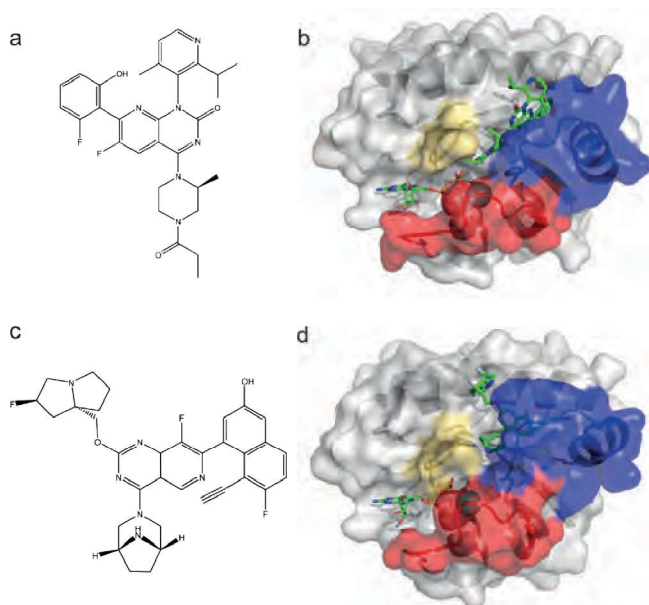
Inhibitory małowęgłocząstkowe

Celowanie w KRASG12C opiera się na nukleofilowości tioli cysteinowych. Dlatego też zaletą tej strategii jest fakt, że pozwala na selektywne wiązanie mutantu G12C nie wpływając na natywne białko KRAS. Zmutowana Cysteina 12 zlokalizowana jest w Pętli P, w sąsiedztwie kieszeni nukleotydu oraz regionów przełącznika I i II kluczowych dla interakcji z białkami efektorowymi szlaków sygnalizacyjnych [8].

Sotorasib [AMG510; Lumakras™] jako pierwszy opracowany inhibitor uzyskał zgodę na rozpoczęcie badań klinicznych, a następnie 28 maja 2021 r. został zatwierdzone przez FDA i 10 stycznia 2022 przez EMA do leczenia dorosłych pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym niedrobnokomórkowym rakiem płuca z mutacją KRASG12C (NSCLC) [9]. Nieodwracalne kowalencyjne wiązanie pomiędzy głowicą akryloamidową inhibitora a grupą tiolową reszty cysteiny 12 stanowi kluczową terapeutycznie właściwość AMG510 [34]. AMG510 wiąże trzecią klasę kieszeni KRAS określaną mianem

kieszeni Stwitch II/ α 3 oraz wykazuje interakcje z resztami pętli P oraz przełącznika I i II [22]. Inhibitor wykorzystuje „ukrytą kieszeń” w rejonie SII-P utworzoną przez reszty H95/Y96/Q99. Pomiedzy Y96 a chinazoliną występują oddziaływania π - π , natomiast Q99 i H95 oddziałują poprzez mostki wodne [35], [36].

Wpływ jaki AMG510 wywiera na strukturę i zmiany konformacji KRASG12C opiera się na stabilizacji nieaktywnej formy KRAS związanej z GDP. Kowalencyjne wiązanie AMG510 obniża energię swobodną wiązania KRASG12C – GDP, zwiększając tym samym powinowactwo pomiędzy KRASG12C a GDP. W konsekwencji zmniejsza się elastyczność obszarów przełącznikowych (przełącznika I i II) kluczowych dla wiązania i hydrolizy GTP oraz aktywacji białka. Domena katalityczna rodziny RAS ma względnie stałą konformację z wyjątkiem dwóch obszarów przełącznikowych (SI i SII), których konformacje wpływają na interakcje z innymi białkami. Obszary te charakteryzują się dynamicznymi skorelowanymi ruchami, zapewniając obszary oddziaływać z innymi białkami. Po związaniu AMG510 fluktuacje obszarów przełącznikowych zmniejszają się. AMG510 stabilizuje wiązanie między Cys12 a resztami obszaru przełącznika I (Tyr32, Asp30, Thr35, Asp38), co powoduje usztywnienie kieszeni wiążącej nukleotydy. Wiązanie AMG510 nie utrzymuje KRAS w pojedynczej konformacji o uporządkowanych, całkowicie zamkniętych regionach przełącznika I i II czego można by oczekiwać na podstawie jego struktury krystalicznej [PDB ID: 6OIM], lecz jest to zestaw konformacji [36]. Fluktuacje reszt aminokwasowych są ograniczone, uniemożliwiając przejście do w pełni otwartej formy kieszeni wiążącej nukleotydy, która zapewnia interfejs dla interakcji z czynnikiem wymiany nukleotydów SOS1. Uniemożliwienie oddziaływania z SOS1 zamyka białko w stanie nieaktywnym związanym z GDP [16].



Rys. 7. a) Struktura chemiczna inhibitora AMG510 – Sotorasib; b) kompleks AMG510 z KRAS G12C [PDB ID 8G47]; c) wzór chemiczny inhibitora MRTX1133; d) kompleks MRTX1133 z KRAS G12D [PDB ID: 7RPZ]

Mutacja onkogenna KRAS^{G12D} jest istotnym celem w terapii przeciwnowotworowej ze względu na jej częste występowanie i rolę w nowotworach litych. W przeciwieństwie do mutacji KRASG12C, gdzie efekt inhibicji wynika z obecności nukleofilowej cysteiny tworzącej silne wiązanie kowalencyjne z elektrofilową częścią inhibitora, hamowanie mutantu asparaginianowego jest trudniejsze ze względu na brak reaktywnej reszty w obszarze kieszeni przełącznika II takiej jak C12, co uniemożliwia stabilne nieodwracalne wiązanie kowalencyjne

zmutowanej Asp12 [37]. Odwracalny drobnocząsteczkowy inhibitor niekowalencyjny MRTX1133 opracowany przez firmę Mirati Therapeutics jako pierwszy kompensuje tę trudność i selektywnie wiąże się z KRASG12D wykazując silne powinowactwo wiązania ($-73,16 \pm 5,15$ kcal/mol). Energia ta rozłożona na poszczególne reszty, ujawnia, że reszty Asp69, His95, Met72, Tyr64, Gly60, Asp12 i Val9 mają największy udział w energii wiązania MRTX1133 [38]. Szacowana wartość stałej dysocjacji KD wynosząca 0,2 pM wskazuje na bardzo silne i specyficzne wiązanie między MRTX1133 a białkiem KRAS^{G12D} [39].

Mechanizm działania MRTX1133 opiera się na stabilizacji obszaru wiążącego białko wskutek podwyższenia hydrofobowości, czego efektem są ruchy przełączników I i II, zaburzające oddziaływania z białkami efektorowymi i regulatorowymi, warunkującymi aktywację ścieżek sygnalizacyjnych [38]. MRTX1133 wykazywał silną aktywność komórkową, hamując fosforylację ERK w linii komórkowej AGS z IC50 wynoszącym 2nM. W badaniach in vivo na mysim modelu guza ksenograficznego w linii komórkowej Panc 0403 (mutacja KRASG12D), MRTX1133 wykazał dawkowo zależną aktywność przeciwnowotworową. Przy dawce 30 mg/kg podanej dootrzewnowo, MRTX1133 skutecznie hamował wzrost guza, a przy wyższych dawkach powodował jego regresję [39]. W marcu 2023 r. rozpoczęto fazę I/II badań klinicznych produktu leczniczego zawierającego MRTX1133 jako API (NCT05737706) u dorosłych pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi m.in. NSCLC, PDAC, rak jelita grubego i odbyticy.

Podsumowanie

Białko KRAS jest jednym z najczęściej mutujących białek przekaznikowych. Jego liczne mutacje powiązane są z wieloma typami nowotworów, które jeszcze do niedawna uznawane były za nowotwory nie poddające się terapii farmakologicznej. Niemniej jednak, dzięki blisko czterem dekadom badań udało się wprowadzić do farmakoterapii dwa związki wspomagające terapię niedrobnokomórkowego raka płuc zależnego od mutacji KRASG12C czy też nowotworu jelita grubego oraz okrężnicy. Warto również dodać, że obecnie na różnych etapach badań czy to przedklinicznych czy też klinicznych w fazie I lub II jest ponad 12 związków z dużym potencjałem terapeutycznym [1].

Mgr inż. Dagmara ŁOPATKO jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Pracę dyplomową z zakresu wykorzystania metod obliczeniowych w projektowaniu oligoamidowych sond molekularnych zdolnych rozpoznawać powierzchnię białka KRAS, wykonała pod opieką dra inż. Michała Jewgińskiego.

Dr inż. Michał JEWGIŃSKI jest absolwentem Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Pracę doktorską skupiającą się na badaniach strukturalnych i biologicznych dehydropeptydowych mimetyków obronił pod opieką profesora dr hab. Inż. Pawła Kafarskiego na Uniwersytecie Opolskim w roku 2009. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest autorem i współautorem 30 publikacji. Jego obecne zainteresowania naukowe skupiają się wokół projektowania, syntezy i badania oddziaływania zarówno niskocząsteczkowych inhibitorów jak i sond foldamerowych, zdolnych oddziaływać z powierzchniami białek z grupy betalaktamaz oraz z rodziny Ras.

LITERATURA

- [1] C. V Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat, and L. Soucek, "Drugging the 'undruggable' cancer targets," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 502–508, 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.36.
- [2] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

- [3] A. D. Cox and C. J. Der, "Ras history," *Small GTPases*, vol. 1, no. 1, pp. 2–27, Jul. 2010, doi: 10.4161/sgtp.1.1.12178.
- [4] J. Timar and K. Kashofer, "Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1029–1038, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09915-5.
- [5] K. Parikh *et al.*, "Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, p. 152, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01375-4.
- [6] J. C. Hunter, A. Manandhar, M. A. Carrasco, D. Gurbani, S. Gondi, and K. D. Westover, "Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations," *Mol. Cancer Res.*, vol. 13, no. 9, pp. 1325–1335, Sep. 2015, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203.
- [7] K. Nyíri, G. Koppány, and B. G. Vértessy, "Structure-based inhibitor design of mutant RAS proteins—a paradigm shift," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1091–1105, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09914-6.
- [8] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, and K. M. Shokat, "K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions," *Nature*, vol. 503, no. 7477, pp. 548–551, 2013, doi: 10.1038/nature12796.
- [9] K. S. De, "Sotorasib: First Approved KRAS Mutation Inhibitor for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 30, no. 9, pp. 1000–1002, 2023, doi: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867329666220907161505>.
- [10] G. A. Hobbs, C. J. Der, and K. L. Rossman, "RAS isoforms and mutations in cancer at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 7, pp. 1287–1292, Apr. 2016, doi: 10.1242/jcs.182873.
- [11] A. E. Karnoub and R. A. Weinberg, "Ras oncogenes: split personalities," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 7, pp. 517–531, 2008, doi: 10.1038/nrm2438.
- [12] A. García-España and M. R. Philips, "Origin and Evolution of RAS Membrane Targeting," *Oncogene*, vol. 42, no. 21, pp. 1741–1750, 2023, doi: 10.1038/s41388-023-02672-z.
- [13] J. Kochen Rossi, C. Nuevo-Tapióles, and M. R. Philips, "Differential functions of the KRAS splice variants," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 51, no. 3, pp. 1191–1199, May 2023, doi: 10.1042/BST20221347.
- [14] M. Janakiraman *et al.*, "Genomic and Biological Characterization of Exon 4 KRAS Mutations in Human Cancer," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 14, pp. 5901–5911, Jul. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0192.
- [15] J. M. L. Ostrem and K. M. Shokat, "Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 11, pp. 771–785, 2016, doi: 10.1038/nrd.2016.139.
- [16] Y. Li, L. Han, and Z. Zhang, "Understanding the influence of AMG 510 on the structure of KRASG12C empowered by molecular dynamics simulation," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 20, pp. 1056–1067, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2022.02.018.
- [17] S. Cao, S. Chung, S. Kim, Z. Li, D. Manor, and M. Buck, "K-Ras G-domain binding with signaling lipid phosphatidylinositol (4,5)-phosphate (PIP2): membrane association, protein orientation, and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 17, pp. 7068–7084, Apr. 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.004021.
- [18] M. Schmick *et al.*, "KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport," *Cell*, vol. 157, no. 2, pp. 459–471, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.051.
- [19] S. L. Campbell and M. R. Philips, "Post-translational modification of RAS proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 71, pp. 180–192, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.015>.
- [20] X. Nan *et al.*, "Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 26, pp. 7996–8001, Jun. 2015, doi: 10.1073/pnas.1509123112.
- [21] J. Cherfills and M. Zeghouf, "Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 269–309, Jan. 2013, doi: 10.1152/physrev.00003.2012.
- [22] Z. Zhao, N. Bohidar, and P. E. Bourne, "Analysis of KRAS–Ligand Interaction Modes and Flexibilities Reveals the Binding Characteristics," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 63, no. 4, pp. 1362–1370, Feb. 2023, doi: 10.1021/acs.jcim.3c00097.
- [23] M. Roman, E. Hwang, and E. A. Sweet-Cordero, "Synthetic Vulnerabilities in the KRAS Pathway," *Cancers*, vol. 14, no. 12, 2022, doi: 10.3390/cancers14122837.
- [24] M. Nagasaka, Y. Li, A. Sukari, S.-H. I. Ou, M. N. Al-Hallak, and A. S. Azmi, "KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne?," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 84, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101974.
- [25] M. V. Milburn *et al.*, "Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins," *Science (80-.)*, vol. 247, no. 4945, pp. 939–945, Feb. 1990, doi: 10.1126/science.2406906.
- [26] D. Filchtinski, O. Sharabi, A. Rüppel, I. R. Vetter, C. Herrmann, and J. M. Shifman, "What Makes Ras an Efficient Molecular Switch: A Computational, Biophysical, and Structural Study of Ras-GDP Interactions with Mutants of Raf," *J. Mol. Biol.*, vol. 399, no. 3, pp. 422–435, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.046>.
- [27] T. Takács, G. Kudlik, A. Kurilla, B. Szeder, L. Buday, and V. Vas, "The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1051–1065, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09912-8.
- [28] A. K. Murugan, M. Grieco, and N. Tsuchida, "RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 59, pp. 23–35, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.007>.
- [29] L. Huang, Z. Guo, F. Wang, and L. Fu, "KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, p. 386, 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.
- [30] D. Rabara *et al.*, "KRAS G13D sensitivity to neurofibromin-mediated GTP hydrolysis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 44, pp. 22122–22131, Oct. 2019, doi: 10.1073/pnas.1908353116.
- [31] S. Dogan *et al.*, "Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related KRAS-Mutant Cancers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 22, pp. 6169–6177, Nov. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
- [32] F. Liu, X. Yang, M. Geng, and M. Huang, "Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 4, pp. 552–562, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.008.
- [33] Y. Peng, Y. Wang, C. Zhou, W. Mei, and C. Zeng, "PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway?," *Front. Oncol.*, vol. 12, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.819128.
- [34] J. Canon *et al.*, "The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity," *Nature*, vol. 575, no. 7781, pp. 217–223, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1694-1.
- [35] T. Pantsar, "KRAS(G12C)–AMG 510 interaction dynamics revealed by all-atom molecular dynamics simulations," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 11992, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68950-y.
- [36] T. Pantsar, "The current understanding of KRAS protein structure and dynamics," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 18, pp. 189–198, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.004.
- [37] V. Dunnett-Kane, P. Nicola, F. Blackhall, and C. Lindsay, "Mechanisms of Resistance to KRASG12C Inhibitors," *Cancers*, vol. 13, no. 1, 2021, doi: 10.3390/cancers13010151.
- [38] A. R. Issahaku *et al.*, "Characterization of the binding of MRTX1133 as an avenue for the discovery of potential KRASG12D inhibitors for cancer therapy," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 17796, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-22668-1.
- [39] D. Tang and R. Kang, "Glimmers of hope for targeting oncogenic KRAS-G12D," *Cancer Gene Ther.*, vol. 30, no. 3, pp. 391–393, 2023, doi: 10.1038/s41417-022-00561-3.