

同行专家业内评价意见书编号: 20250860059

附件1

浙江工程师学院（浙江大学工程师学院）
同行专家业内评价意见书

姓名: 金世璐

学号: 22260867

申报工程师职称专业类别（领域）: 生物与医药

浙江工程师学院（浙江大学工程师学院）制

2025年05月27日

填表说明

一、本报告中相关的技术或数据如涉及知识产权保护、军工项目保密等内容，请作脱密处理。

二、请用宋体小四字号撰写本报告，可另行附页或增加页数，A4纸双面打印。

三、表中所涉及的签名都必须用蓝、黑色墨水笔，亲笔签名或签字章，不可以打印代替。

四、同行专家业内评价意见书编号由工程师学院填写，编号规则为：年份4位+申报工程师职称专业类别(领域)4位+流水号3位，共11位。

一、个人申报

(一) 基本情况【围绕《浙江工程师学院(浙江大学工程师学院)工程类专业学位研究生工程师职称评审参考指标》，结合该专业类别(领域)工程师职称评审相关标准，举例说明】

1. 对本专业基础理论知识和专业技术知识掌握情况(不少于200字)

在浙江大学工程师学院生物与医药专业深造期间，我系统学习构建了创新药物研发的知识体系。通过《新药创制工程前沿》课程掌握了从靶点验证到临床前研究的全流程开发策略，结合《药物设计理论与实践》初步理解了基于结构的药物设计和计算机辅助药物设计的技术原理。在《生物技术制药》课程中熟练掌握了抗体工程、基因治疗、细胞治疗等生物药开发关键技术，同时《现代药理学实验技术》课程使我建立起系统的药效学评价与机制研究理论框架。《新药发现理论与实践》、《实用药物分析》等等各核心课程均取得90分以上的优异成绩，特别是在信号通路调控机制等专业领域形成了扎实的理论储备。在企业实践中，专注于小分子药物的联用机制研究，成功验证其协同抗肿瘤效应并阐明作用机制。熟练运用Western Blot、流式细胞术、分子克隆等技术，搭建涵盖细胞增殖、周期和凋亡、克隆形成、迁移侵袭及信号通路检测的完整药效评价体系。具备扎实的药物开发理论功底与创新药物研发的工程化实践能力。

2. 工程实践的经历(不少于200字)

2023年，本人在杭州健艾仕生物医药科技(杭州)有限公司开展专业实践训练，主导两项小分子抑制剂联用抗肿瘤研究。第一项聚焦已上市AKT抑制剂与KRAS G12C抑制剂的协同效应，通过CCK8法证实联用组细胞增殖抑制活性显著增强，流式细胞术揭示联用诱导G0/G1期阻滞和促进凋亡；Western Blot验证其对PI3K/AKT/mTOR与MAPK信号通路的抑制。第二项创新性探索JAK抑制剂与KRAS G12C抑制剂的联合方案，发现其通过阻断JAK-STAT与RAS信号的下游交叉调控，使细胞增殖抑制活性显著增强，并利用分子克隆技术构建突变株和耐药株优化模型。实践期间系统构建包含细胞周期、凋亡、克隆形成、迁移侵袭及关键信号通路检测的完整药效评价体系，运用GraphPad Prism完成协同指数计算和数据分析，明确两组合的协同作用机制。研究成果为克服靶向治疗耐药性、提升临床疗效提供了重要实验依据，相关数据已发表以及作为企业申请专利的支撑材料。

3. 在实际工作中综合运用所学知识解决复杂工程问题的案例(不少于1000字)

KRAS基因是恶性肿瘤中最常见的驱动基因，其突变在非小细胞肺癌(30%)、胰腺导管癌(90%)及结直肠癌(40%)中占比显著，其中G12位点突变占83%。G12C突变在肺癌中占比达46%，但在结直肠癌中仅3%，提示突变谱的癌种差异性。KRAS蛋白通过GTP/GDP转换调控细胞信号传导，而突变体因GTP酶活化蛋白(GAP)功能受损，导致GTP持续结合，下游通路(如RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT/mTOR)异常激活，驱动肿瘤增殖。并且由于KRAS蛋白表面平滑且与GTP结合力极强(皮摩尔级)，长期被视为“不可成药”靶点。然而KRAS G12C突变中半胱氨酸的强亲核性为共价抑制剂开发提供突破口，AMG510(2021年FDA批准)和MRTX849(2022年上市)通过共价结合突变位点，锁定KRAS于失活状态，抑制肿瘤生长。然而临床数据显示，耐药情况是常见问题，包括原发性耐药和获得性耐药，其中涉及KRAS二次突变、旁路激活(如EGFR/MYC)等机制。

为克服耐药，联合治疗成为重要策略。临床上常见联用方案包括与西妥昔单抗、SHP2抑制剂、MEK抑制剂、帕博利珠单抗、化疗药物等，上述联用旨在通过多种机制增强抗肿瘤活性，尤其是KRAS G12C突变的非小细胞肺癌、结直肠癌和其他实体瘤。

据报道，在胰腺癌中，ERK信号介导的细胞凋亡通常会诱导AKT信号通路的激活，从而抵抗凋亡发生，也有报道指出KRAS通过激活PI3K-AKT通路促进细胞存活，同时AKT信号的激活会增加癌细胞存活和对药物诱导的细胞凋亡的抵抗，因此上述研究提示，KRAS G12C抑制剂和AKT抑制剂联用，有望更全面地阻断肿瘤细胞的信号传导，抑制抗凋亡相关蛋白的表达，促进细胞凋亡，从而抑制肿瘤细胞增殖。基于上述设想，开展临床研究调研和文献调研，结合所学肿瘤药理等相关知识，设计开展AKT抑制剂卡帕塞替尼（Capivasertib）联用KRAS G12C抑制剂的抗肿瘤活性以及机制研究。

本项目通过体外实验评估AKT抑制剂卡帕塞替尼与KRAS G12C抑制剂（AMG510/MRTX849）联合用药对携带该基因突变肿瘤细胞的协同效应。采用CCK8法测定单药IC50值及联用的增殖抑制效果，结合联合指数评价协同作用；通过Western blot分析AKT/ERK通路磷酸化水平及凋亡相关蛋白表达；运用细胞周期/凋亡检测试剂盒、Hoechst33258染色检测细胞周期变化以及凋亡影响，并结合克隆形成与划痕实验评估联用对增殖及迁移的抑制作用，系统揭示药物联用调控关键信号通路实现协同抗肿瘤的分子机制。结果显示，在含KRAS G12C突变的非小细胞肺癌NCI-H358、胰腺癌MIA-PACA2、结直肠癌SW1463等肿瘤细胞系中都体现出良好的协同作用，进一步研究表明，其联用机制是通过抑制抗凋亡蛋白BCL-x1和BCL-2的表达，诱导G1期阻滞，促进细胞凋亡，抑制细胞增殖。

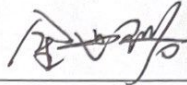
在KRAS G12C突变阳性的肿瘤患者中，联合使用KRAS G12C抑制剂和AKT抑制剂可能成为一种新的治疗策略。本研究提供了KRAS G12C抑制剂和AKT抑制剂联用治疗的新证据，为后续的深入机制研究打下了扎实的基础。上述联合治疗具有一定的临床应用前景，有助于优化KRAS G12C突变相关肿瘤的治疗方案，提高患者的生存率和生活质量。本研究成果已被中国现代应用药理学杂志录用（本人一作，待发表），未来可进一步优化剂量方案并评估安全性，以改善KRAS突变肿瘤患者的生存预后。

(二)取得的业绩(代表作)【限填3项,须提交证明原件(包括发表的论文、出版的著作、专利证书、获奖证书、科技项目立项文件或合同、企业证明等)供核实,并提供复印件一份】

1. 公开成果代表作【论文发表、专利成果、软件著作权、标准规范与行业工法制定、著作编写、科技成果获奖、学位论文等】

成果名称	成果类别 [含论文、授权专利(含发明专利申请)、软件著作权、标准、工法、著作、获奖、学位论文等]	发表时间/ 授权或申 请时间等	刊物名称 /专利授权 或申请号等	本人 排名/ 总人 数	备注
论文发表	核心期刊		中国现代应 用药学	1/3	录用

2. 其他代表作【主持或参与的课题研究项目、科技成果应用转化推广、企业技术难题解决方案、自主研发设计的产品或样机、技术报告、设计图纸、软课题研究报告、可行性研究报告、规划设计方案、施工或调试报告、工程实验、技术培训教材、推动行业发展中发挥的作用及取得的经济社会效益等】

(三) 在校期间课程、专业实践训练及学位论文相关情况	
课程成绩情况	按课程学分核算的平均成绩: 90 分
专业实践训练时间及考核情况(具有三年及以上工作经历的不作要求)	累计时间: 7.8 年(要求1年及以上) 考核成绩: 91 分
本人承诺	
个人声明: 本人上述所填资料均为真实有效, 如有虚假, 愿承担一切责任, 特此声明!	
申报人签名: 	

浙江大学研究生院
攻读非全日制硕士学位研究生成绩表

学号：22260867		姓名：金世璐		性别：男		学院：工程师学院		专业：生物与医药				学制：2.5年			
毕业时最低应获：24.0学分				已获得：24.0学分				入学年月：2022-09				毕业年月：			
学位证书号：						毕业证书号：						授予学位：			
学习时间		课程名称		备注	学分	成绩	课程性质	学习时间		课程名称		备注	学分	成绩	课程性质
2022-2023学年秋冬学期		工程伦理			2.0	94	公共学位课	2022-2023学年春夏学期		现代药理学实验技术			2.0	95	专业选修课
2022-2023学年秋冬学期		生物技术制药			2.0	93	专业选修课	2022-2023学年春夏学期		新药发现理论与实践			2.0	92	专业学位课
2022-2023学年秋冬学期		实用药物分析			2.0	95	专业选修课	2022-2023学年春夏学期		科技写作			2.0	80	专业学位课
2022-2023学年秋冬学期		新药创制工程前沿			3.0	93	专业学位课	2022-2023学年春夏学期		药物设计理论与实践			2.0	88	专业选修课
2022-2023学年秋冬学期		自然辩证法概论			1.0	85	公共学位课	2022-2023学年春夏学期		生物医药文献阅读			2.0	94	专业学位课
2022-2023学年春夏学期		研究生英语			2.0	81	公共学位课	2022-2023学年春夏学期		新时代中国特色社会主义思想理论与实践			2.0	89	公共学位课

说明：1. 研究生课程按三种方法计分：百分制，两级制（通过、不通过），五级制（优、良、中、及格、不及格）。

2. 备注中“*”表示重修课程。

学院成绩校核章：
成绩校核人：张梦依
打印日期：2025-06-03

浙江大学研究生院
(60)
成绩校核章

录用证明

金世璐,俞强,盛荣 作者:

您的题为 AKT抑制剂Capivasertib协同增强KRAS
G12C抑制剂的抗肿瘤活性 , 编号为 **20243552**
的论文, 经审阅, 决定在《中国现代应用药学》杂志正式刊出。

特此证明!

《中国现代应用药学》编辑部



第一作者: 金世璐 浙江大学

通信作者: 盛荣 浙江大学

网址: <http://www.chinmap.com/>

地址: 杭州市滨江区平乐街325号浙江省食品药品检验研究院2楼212室 中国现代应用药学杂志社

邮编: 310052 电话: (0571) 87297398 E-mail: xdyd@chinajournal.net.cn

稿件状态查询: 关注本刊微信公众号(中国现代应用药学杂志社)——菜单栏——论文查询——稿件查询
输入稿件编号或者作者姓名即可查询稿件录用状态。



(扫码关注本刊微信公众号)

AKT 抑制剂 Capivasertib 协同增强 KRAS G12C 抑制剂的抗肿瘤活性

金世璐^{1,2}, 俞强², 盛荣¹(1.浙江大学, 浙江省杭州市 310000; 2.健艾仕生物医药科技(杭州)有限公司, 浙江省杭州市 310000)

摘要: 目的 探索 KRAS G12C 抑制剂和 AKT 抑制剂卡帕塞替尼联用对 KRAS G12C 突变肿瘤细胞的抗肿瘤活性及作用机制。方法 以含有 KRAS G12C 突变的人胰腺癌细胞 MIA-PACA2 和人非小细胞肺癌 NCI-H358 等肿瘤细胞为模型, 采用 CCK8 法、流式细胞术、Western blotting、克隆形成实验等分别考察 KRAS G12C 抑制剂和卡帕塞替尼单用或联用对细胞增殖抑制、细胞周期凋亡、胞内相关蛋白表达变化以及细胞克隆形成能力的影响。结果 KRAS G12C 抑制剂和卡帕塞替尼联用显著增强抑制肿瘤细胞增殖, 显著抑制细胞克隆形成, 浓度依赖性地下调 AKT 通路和 ERK 通路相关蛋白的活化或表达, 进而引起肿瘤细胞发生细胞周期阻滞和凋亡。结论 KRAS G12C 抑制剂和卡帕塞替尼联用对 KRAS G12C 突变的肿瘤细胞具有协同抑制作用, 通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡, 发挥对肿瘤细胞显著的抗肿瘤活性。

关键词: KRAS G12C; AKT; Capivasertib; 抗肿瘤活性; 协同作用

AKT Inhibitor Capivasertib Synergically Enhances The Antitumor Activity of KRAS G12C Inhibitor

JIN Shilu^{1,2}, YU Qiang², SHENG Rong¹(1. Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. GenEros Biomedical Technology Hangzhou Co Ltd., Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antitumor activities and mechanisms of the combination of KRAS G12C inhibitors and AKT inhibitor Capivasertib against KRAS G12C mutant tumor cells. **METHODS** Taking KRAS G12C mutation cell lines, including human pancreatic cancer cell line MIA-PACA2 and human non-small cell lung cancer NCI-H358 as in vitro model, the CCK8 assay, flow cytometry, Western blotting, colony formation assay were performed to investigate the effects of KRAS G12C inhibitor in combination with capmatinib or alone on cell proliferation inhibition, cell cycle apoptosis, the expression of intracellular related proteins and the ability of colony formation, respectively. **RESULTS** The combination of KRAS G12C inhibitor and Capivasertib significantly enhanced the inhibition of tumor cell proliferation, cell migration, and colony formation, and down-regulated the activation or expression of AKT pathway and ERK pathway-related proteins in a concentration-dependent manner, thereby inducing cell cycle arrest and apoptosis of tumor cells. **CONCLUSION** The combination of KRAS G12C inhibitor and Capivasertib has synergistic effects on KRAS G12C mutant tumor cells, and exerts significant antitumor activities through inducing cell cycle arrest and apoptosis.

KEY WORDS: KRAS G12C inhibitor; AKT inhibitor Capivasertib; Antitumor activity; synergistic effect

克里斯汀鼠肉瘤病毒癌基因 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS) 是人类癌症中最常见的致癌基因, KRAS 突变多见于肺、胰腺、直肠等。在 KRAS 突变中, G12 的单氨基酸突变占 83%[1], 大约 30% 的非小细胞肺癌 (NSCLC), 90% 的胰腺导管癌 (PDAC), 40% 的结直肠癌 (CRC), 均由 KRAS 突变驱动[2, 3]。KRAS 突变主要发生在 12、13 号密码子处, 其中肺癌中 KRAS G12C 突变所占比例高达 46%[4], 结直肠癌中 G12C 突变占结直肠癌中 3%[5]。目前处于临床阶段的 KRAS 抑制剂主要是 G12 突变抑制剂与泛 KRAS 抑制剂。

KRAS 蛋白通过响应细胞外信号, 在结合三磷酸鸟苷 (guanine triphosphate, GTP) 的激活状态 (ON) 与结合二磷酸鸟苷

(guanosine 5'diphosphate, GDP) 的失活状态 (OFF) 之间循环转换, 保持正常的生物功能。而发生突变的 KRAS 蛋白, GTP 酶活化蛋白 (GTPase Activating Protein, GAP) 对 GTP 水解受限从而阻止 RAS 蛋白从 GTP 状态向 GDP 状态转换, 形成持续激活的 GTP 结合状态。KRAS 活性因此也变得独立于细胞外刺激, 导致下游通路的过度激活, 促进细胞存活、增殖以及信号转移[6]。

KRAS 蛋白一度被视为“不可用药的靶点”, 一方面是其活性状态下以皮摩尔级亲和力与三磷酸鸟苷 GTP 结合, 且 GTP 在血液中浓度较高 ($>300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 另一方面是 KRAS 蛋白表面相对平滑, 缺少小分子结合的口袋[7]。KRAS G12C 是 12 位甘氨酸 (Gly) 突变成半胱氨酸 (Cys),

由于 Cys 的巯基 (-SH) 具有强亲核性, 导致一系列共价小分子抑制剂的发现。该类小分子通过 Michael 受体丙烯酰胺, 与 Cys 的巯基发生共价结合, 阻止鸟苷酸交换因子 (guanosine exchange factor, GEF) 催化 GTP 向鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP) 转化, 促使 KRAS G12C 基因突变体处在与 GDP 结合的无活性状态, 从而抑制其细胞增殖活性[8]。2021 年, AMG510 首先获批治疗携带 KRAS G12C 突变的非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者, 2022 年, 第二款 KRAS G12C 抑制剂 MRTX849 获批, 2024 年, 劲方医药的 GFH925/IBI351 获批上市。

但是, 在临床前动物模型和临床研究中, 已经观察到对 AMG510 和 MRTX849 的原发性耐药[9, 10]和适应性耐药问题[11]。通过对 43 名 KRAS(G12C)抑制剂 sotorasib 治疗患者的样本比对, 27 名患者中观察到基因突变, 包括 KRAS、NRAS、BRAF、EGFR、FGFR2、MYC 和其他基因的改变[12]。为提高 KRAS G12C 抑制剂的抗肿瘤效果, MRTX849 与西妥昔单抗[13]、JDQ443 与 SHP2 抑制剂 TNO155[14]、AMG510 与 MEK 抑制剂曲美替尼[15]、MRTX849 与如帕博利珠单抗[16], 以及 AMG510 与化疗药物多西他赛[17]的联用已经进入临床, 上述联用旨在通过多种机制增强抗肿瘤活性, 尤其是 KRAS G12C 突变的非小细胞肺癌、结直肠癌和其他实体瘤。

KRAS 蛋白通过多条下游通路调控, 包括 RAS/RAF/ MAPK 通路, PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 以及 RAS/RAS 关联域家族蛋白 (RAS association domain family, RASSF) 通路等。其中, AKT 是 PI3K/AKT/mTOR 信号级联的中心节点[18, 19], 在多种肿瘤中过表达[20, 21]。卡帕塞替尼 (Capivasertib, Cap) 是全球唯一获批的 AKT 抑制剂, 其和氟维司群联用, 临床治疗芳香酶抑制剂耐药的 HR+/HER2-晚期乳腺癌[22]。此外, 罗氏的 ipatasertib (GDC-0068) [23]、来凯医药的 afuresertib (LAE002) 等 AKT 抑制剂也进入 III 临床研究阶段[24]。

据报道, 在胰腺癌中, KRAS 抑制诱导 AKT 过度激活[25], 在 PI3K/AKT/mTOR 通路中, 抗凋亡蛋白的上调是耐药的重要机制。Bcl-2 和 Bcl-xL 等蛋白质在这种情况下起着关键作用[26]。同时也有报道指出 AKT 蛋白的抑制会显著

降低携带 KRAS 突变的胰腺癌细胞系的增殖[27]。上述研究提示, 联用 KRAS G12C 抑制剂和 AKT 抑制剂, 有望更全面地阻断肿瘤细胞的信号传导, 抑制抗凋亡蛋白的表达, 诱导细胞凋亡, 从而抑制肿瘤细胞增殖。基于上述设想, 本研究采用体外细胞实验, 探讨 Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂联用对 KRAS G12C 突变肿瘤细胞的抗肿瘤效果, 并探索其作用机制, 为后续研究提供基础。

1 仪器与材料

TECAN 酶标仪 (瑞士帝肯公司); ACEA NovoCyte 系列流式细胞仪(美国 Agilent 公司); Bio-Rad 电泳和印迹系统(美国伯乐公司); Tanon-5200 全自动化学发光图像分析系统(中国天能科技公司); Thermo 1374 生物安全柜 (美国赛默飞公司); Thermo Heracell VIOS 160i CO₂ 培养箱 (美国赛默飞公司); 奥林巴斯 CKX53 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); 梅特勒 ME204 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

MIA-PACA2 细胞、NCI-H358 细胞、NCI-H2122 细胞、SW1463 细胞、SW837 细胞和 Calu-1 细胞购自武汉诺普赛生物生命科技有限公司; YF®488-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒 (优逸兰迪, 货号: Y6002L); 细胞周期检测试剂盒 (优逸兰迪, 货号: C6078); CCK8 试剂 (全式金, 货号: FC101-01); 结晶紫染色液 (碧云天, 货号: C0121); pErk1/2 (T202/Y204) 抗体 (CST, 货号: 4370T)、p-AKT1 (Ser473) 抗体 (CST, 货号: 9018T)、GAPDH 抗体 (生工, 货号: D110016); 山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Biosharp, 货号: BL003A); BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天, 货号: P0010S); AMG510 (MCE, HY-114277); MRTX849 (MCE, HY-130149); Capivasertib (MCE, 货号: HY-15431)。

2 方法

2.1 CCK8 法检测细胞增殖率

在 96 孔板中接种 2000~4000 个细胞, 每孔 100 μ L 的完全培养基, 在 37 度细胞培养箱中培养 24 h, 细胞中加入 1 μ L 的待测药物, 在细胞培养箱中培养 72 h, 每孔加入培养基总体积 10% 的 CCK Solution, 在细胞培养箱中继续培养 1 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

数据分析: 利用方程式 $1-(\text{Sample-Min})/(\text{Max-Min}) \times 100\%$ 将原始数据换算

成细胞抑制率, 制图分析单药处理组和联用处理组对细胞生长的抑制差异。

2.2 Western Blot 检测蛋白含量及磷酸化水平

在 12 孔板中接种 2×10^5 个 NCI-H358 细胞, 每孔 1 mL 的完全培养基, 在细胞培养箱中培养 24 h。第二天细胞中加入 10 μ L 的待测药物, 放入细胞培养箱中再培养 2 h, 取出细胞, PBS 清洗 1 次, 弃掉上清, 加入 200 μ L RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解, 转移至 1.5 mL 离心管, 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 10 min, 取上清 BCA 法蛋白定量, 加入 $6 \times$ loading buffer 制备样品, 配制 1.5 mm 厚度的蛋白胶, 蛋白电泳, 将蛋白胶取下, 利用湿转法转膜, 转膜结束后, 用 5% 封闭液室温封闭 1 h, $1 \times$ TBST 缓冲液清洗 3 次, 孵育抗体, ECL 发光液孵育, 化学发光检测, 拍照分析结果;

2.3 CCK8 法检测细胞增殖率

在六孔板中接种 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 每孔 2 mL 的完全培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 h; 细胞中加入 20 μ L 的待测药物, 放入 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中再培养 48 h, 取出细胞, 预冷的 PBS 清洗 2 次, 预冷的 4% 多聚甲醛固定 10 min, 弃掉多聚甲醛, 平衡到室温, 加入结晶紫染色液, 染色 30 min, 观察是否上色, 弃掉染色液, 纯净水清洗 3 次, 室温晾干后拍照分析;

数据分析: 在明场环境下, 六孔板下面放置白纸一张, 用相机拍照后制图;

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

在 12 孔板中接种 1×10^5 个细胞, 每孔 1 mL 的完全培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 h, 第二天细胞中加入 10 μ L 的待测药物, 培养 48 h。取出细胞, PBS 清洗细胞 1 次, 加入 0.2 mL 胰酶消化 2 min, 用 1 mL 的完全培养基重悬细胞, 将细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中, 1200 rpm 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL 完全培养基重悬, 放在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 0.5 h, 1200 rpm 离心 5 min, 弃上清, 1 mL 预冷 PBS 清洗一遍, 离心弃掉上清后, 加入 100 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞, 加入 5 μ L YF@488-Annexin V, 轻轻混匀, 加入 5 μ L PI 染色液, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 孵育完成后, 直接加入 400 μ L 的 $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液重悬细胞, 立即上机检测凋亡信号。

数据分析: 用 ACEA NovoExpress 流式软件分

析样本的早期凋亡比例, 用 GraphPad Prism 软件制图分析单药处理组和联用处理组的细胞早期凋亡差异。

2.5 流式细胞术检测细胞周期状态

用细胞周期检测试剂盒对细胞进行染色后, 通过流式细胞术检测细胞周期状态。先用胰酶消化细胞, 加入细胞培养液, 轻轻吹散细胞后, 收集到离心管内。1000 g 左右离心 5 min, 沉淀细胞。小心吸除上清, 加入约 1 mL 预冷的 $1 \times$ 的染色缓冲液 (将 $10 \times$ 的染色缓冲液用双蒸水按 1: 10 稀释), 重悬细胞。重复一次。1000 g 左右离心 5 min, 沉淀细胞。弃上清后, 加入 1 mL 培养基重悬细胞 (对于固定细胞, 也可用 $1 \times$ PBS 重悬)。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。每管细胞样品中加入 4 μ L 的 Red Nucleus I 染色液, 缓慢并充分混匀, 室温避光孵育 20 min (或在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min)。

用流式细胞仪在 638 nm 处激发, 采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和周期分析。组间比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2.6 Hoechst33258 法检测细胞凋亡率

取洁净盖玻片在 75% 乙醇中浸泡 5 min 或更长时间, 无菌超净台内吹干或用无菌的 PBS 洗涤三遍, 再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内, 在六孔板内接种 5×10^5 个细胞培养过夜, 使得第二天约为 70%~80% 的汇合度, 24 h 后加入 5 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ Capivasertib 和 0.01 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ MRTX849, 培养 48 h 之后进行 Hoechst 染色和拍照分析。刺激细胞发生凋亡后, 吸尽培养液, 加入 0.5 mL 固定液, 固定 10 min 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。去固定液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 min, 吸尽液体。加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min。去染色液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 min, 吸尽液体。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 让细胞接触封片液, 尽量避免气泡。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长 350 nm 左右, 发射波长 460 nm 左右。

3 结果

3.1 AMG510 和 MRTX849 对 KRAS G12C 突变的肿瘤细胞生长具有明显的抑制活性

在体外细胞增殖实验中, 用不同浓度 AMG510、MRTX849, 分别处理含有 KRAS G12C

突变的肿瘤细胞系，其中纯合突变的有 MIA-PACA2、NCI-H2122 和 SW1463，杂合突变的有 NCI-H358、Calu-1、和 SW837 细胞。结果显示，AMG510 和 MRTX849 呈浓度依赖性地抑制肿瘤细胞的增殖，其中 MIA-PACA2、NCI-H358、SW1463 细胞对两种 KRAS 抑制剂均较为敏感，AMG510 的 IC_{50} 分别为：0.011 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.010 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.043 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ；MRTX849 的 IC_{50} 分别为：0.0058 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.016 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.016 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

MRTX849 对 NCI-H2122、Calu-1 和 SW837

也显示出良好的抑制活性， IC_{50} 分别为：0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2.13 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ；而上述细胞对于 AMG510 不敏感， IC_{50} 分别为：36.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、25.49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 4.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，具体结果见图一。

这些结果均提示 AMG510 和 MRTX849 对 KRAS G12C 突变的肿瘤细胞增殖具有抑制效果，且 MRTX849 的抑制效果较优于 AMG510。其中 MIA-PACA2、NCI-H358、SW1463 细胞为敏感株，而其余细胞相对不敏感，敏感状态和纯合突变或者杂合突变没有明显相关性。

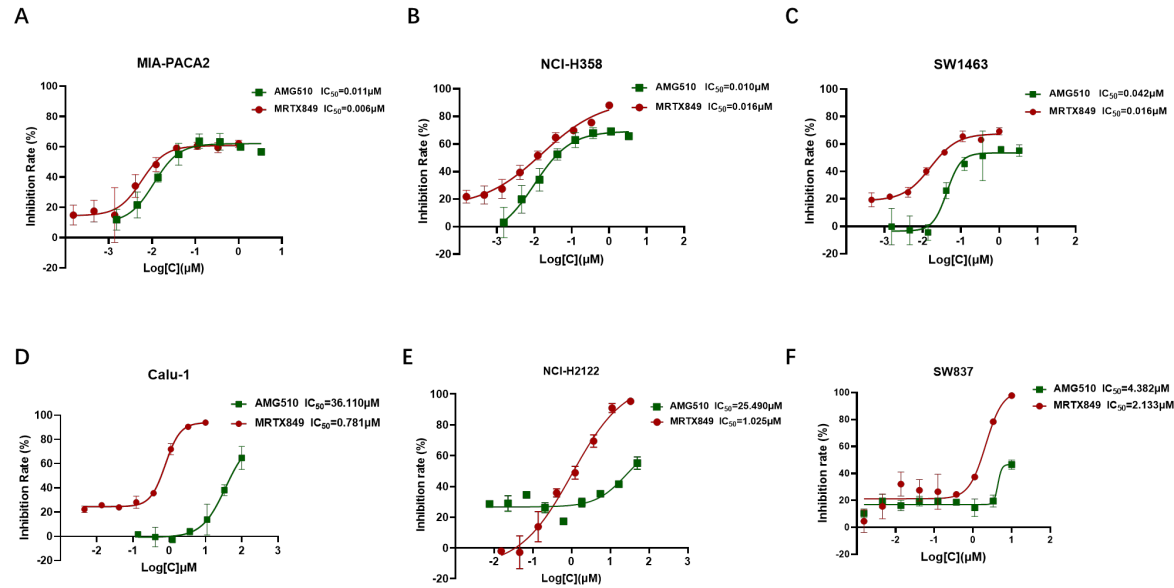


图 1 AMG510、MRTX849 对不同肿瘤细胞的增殖抑制活性

Fig. 1 Inhibitory activity of AMG510 and MRTX849 on proliferation of different tumor cells

3.2 Capiasertib 对 KRAS G12C 突变的肿瘤细胞增殖具有一定的抑制作用

用不同浓度的 Capiasertib 分别处理 MIA-PACA2、NCI-H358、NCI-H2122、Calu-1、SW1463 和 SW837 细胞，Capiasertib 呈浓度依赖

性地抑制 MIA-PACA2、NCI-H358、NCI-H2122 和 Calu-1 细胞的增殖，活性中等， IC_{50} 分别为：20.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、63.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、16.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、12.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而对 SW1463 和 SW837 细胞，无浓度依赖抑制效果，结果见图二。

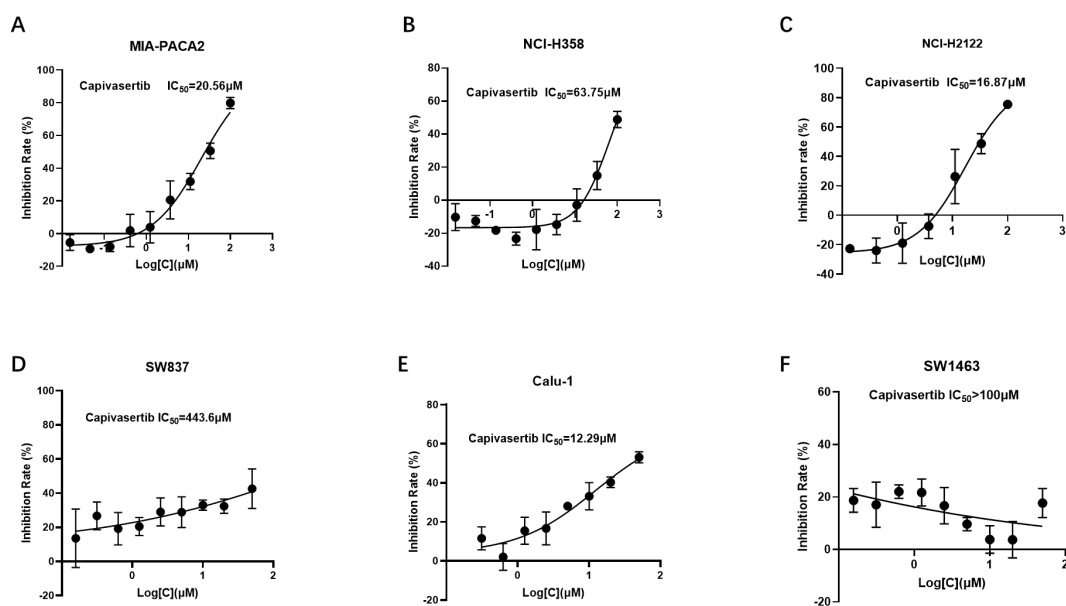


图2 Capiasertib 对不同肿瘤细胞的增殖抑制活性

Fig. 2 Inhibitory activity of Capiasertib on proliferation of different tumor cells

3.3 Capiasertib 增强 KRAS G12C 抑制剂的抗肿瘤效果

将 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Capiasertib 与不同浓度的 AMG510 或 MRTX849 联用, 分别处理上述六株细胞。结果显示, Capiasertib 和 MRTX849 联用显著增强抗肿瘤活性, 其中在 MIA-PACA2、NCI-H358、SW1463 和 Calu-1 细胞中具有明显协

同作用, 当 Capiasertib 和 AMG510 联用时, 在 MIA-PACA2、NCI-H358 和 Calu-1 细胞中具有明显协同作用, 结果见表 1。

CDI 是两药相互作用指数, 当 $\text{CDI} < 1$ 时, 两药作用性质为协同; 当 $\text{CDI} < 0.7$ 时, 协同作用显著; $\text{CDI} = 1$, 则两药的作用性质为相加; $\text{CDI} > 1$, 则两药作用性质为拮抗。

细胞株	Conc. AMG510 (μM)	Conc. MRTX849 (μM)	增殖率 (%)					CDI a	CDI b
			Capiasertib	AMG510	MRTX849	combo510	combo849		
MIA-PACA2*	0.01	0.01	87.15%	87.61%	88.71%	65.30%	58.97%	0.86	0.76
NCI-H358 ⁺	0.01	0.01	68.79%	65.50%	61.97%	33.27%	35.93%	0.74	0.89
Calu-1 ⁺	5.00	1.00	70.71%	90.68%	87.96%	55.32%	42.05%	0.86	0.53
SW1463*	0.01	0.01	75.34%	78.54%	87.41%	60.62%	44.88%	1.02	0.65
SW837 ⁺	5.00	1.00	68.47%	59.46%	49.69%	52.75%	46.08%	1.30	1.56
NCI-H2122*	1.00	1.00	46.85%	41.92%	29.77%	27.74%	18.62%	1.41	1.49

注: (1) *为KRAS G12C纯合突变, +为杂合突变。

(2) Capiasertib的联用浓度都是10 μM。

(3) CDI a表示AMG510联用Capiasertib的相互作用指数; CDI b表示MRTX849联用Capiasertib的相互作用指数。

图3 AMG510 或 MRTX849 联用 Capiasertib 的肿瘤细胞增殖率及两药相互作用指数

Fig. 3 Tumor cell proliferation rate and interaction index of AMG510 or MRTX849 combined with Capiasertib

3.4 联用增强肿瘤细胞的周期 G1 期阻滞

为明确联用的协同机制, 采用流式细胞术考察药物作用后肿瘤细胞周期的变化。将 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Capiasertib 与 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AMG510 在 MIA-PACA2 细胞上处理 48 h, 发现二者 G1 期比例分别 41.1%和 56.4%, 联用后增至

63.1%, 联用组相较于单药组具有显著性差异, P 值 <0.05 ; 同时将 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Capiasertib 与 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MRTX849 在 MIA-PACA2 细胞上处理 48 h, 发现二者 G1 期比例分别 39.9%和 61.4%, 联用后增至 75.8%, 联用组相较于单药组具有显著性差异, P 值 <0.05 ; 具体结果如图四所示。

上述结果表明，Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂能显著诱导肿瘤细胞 G1 期阻滞，进而发挥抗肿瘤活性。

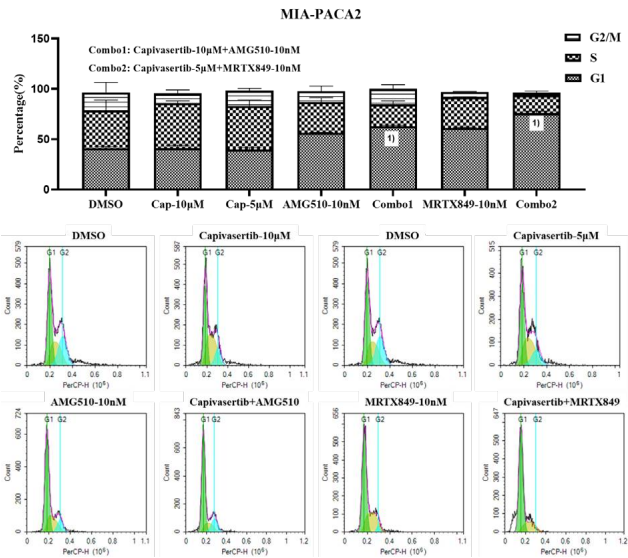


图 4 Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂联用诱导 G1 期阻滞
与 KRAS 抑制剂单药相比，¹⁾*P*<0.05。
Fig. 4 The combination of Capivasertib and KRAS G12C inhibitor induced G1 phase arrest
Compared with KRAS inhibitor monotherapy, ¹⁾*P*<0.05.

3.5 联用对 AKT 信号通路和 ERK 通路的影响

采用 10 μmol·L⁻¹ 的 Capivasertib 与 10 nmol·L⁻¹ 的 AMG510 以及 MRTX849 在 NCI-H358 细胞上处理 24 h，考察相关蛋白的表达和磷酸化程度（图五）。Western blotting 结果显示，Capivasertib 处理 NCI-H358 细胞 24 h 后，p-AKT(S473)和 p-ERK（Thr202/Tyr204）发生明显增加。当 AMG510 或 MRTX849 和 Capivasertib 联用时不降低 AKT 磷酸化，但显著降低 Capivasertib 诱导的 ERK 磷酸化。

凋亡关键蛋白的检测结果显示，二者联用抑制抗凋亡蛋白 BCL-x1 和 BCL-2 的表达，同时显著增强 cleaved-PARP 的含量。以上结果表明，Capivasertib 和 KRAS G12C 抑制剂联用可以抑制 ERK 磷酸化和抗凋亡蛋白的表达，促进凋亡。

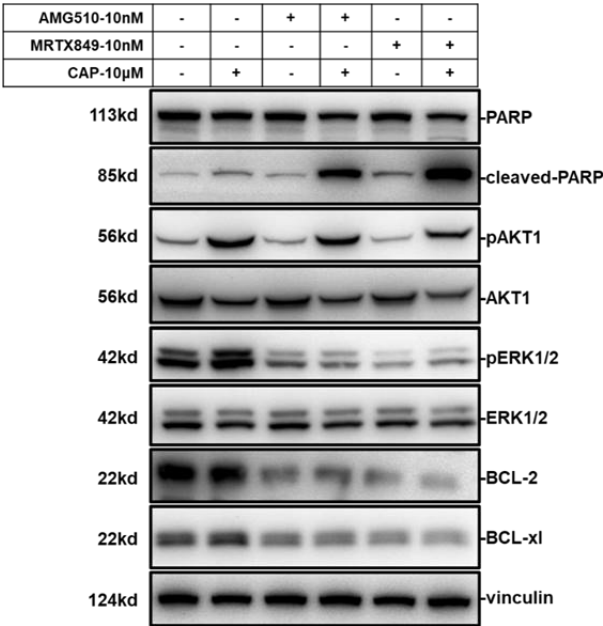


图 5 Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂联用对相关蛋白表达影响
Fig. 5 Effects of Capivasertib combined with KRAS G12C inhibitor on expression of related proteins

3.6 联用促进肿瘤细胞的凋亡

为进一步明确联用对凋亡的影响，将 5 μmol·L⁻¹ 的 Capivasertib 与 10 nmol·L⁻¹ 的 AMG510 在 NCI-H358 细胞上进行联用处理 48 h，胰酶消化收集细胞，流式细胞术检测细胞凋亡率。通过流式结果分析得到 Capivasertib 和 AMG510 联用显著增强肿瘤细胞的早期凋亡比例。另外，将 5 μmol·L⁻¹ 的 Capivasertib 与 10 nmol·L⁻¹ 的 MRTX849 在 MIA-PACA2 细胞上进行联用处理 48h，采用 Hoechst33258 法检测细胞凋亡率。

Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测结果显示，单药 AMG510 处理的早期凋亡占比 7.18%，单药 Capivasertib 处理的早期凋亡占比 4.66%，而二者联用后增至 25.36%；而在 Hoechst33258 法检测 MIA-PACA2 细胞凋亡实验中，发现 MRTX849 和 Capivasertib 联用可以显著增强致密颗粒状荧光细胞比例（红色箭头指出），致密颗粒状荧光细胞表明凋亡状态。以上结果表明，Capivasertib 联用 KRAS G12C 抑制剂可以显著促进肿瘤细胞的凋亡，结果见图六。

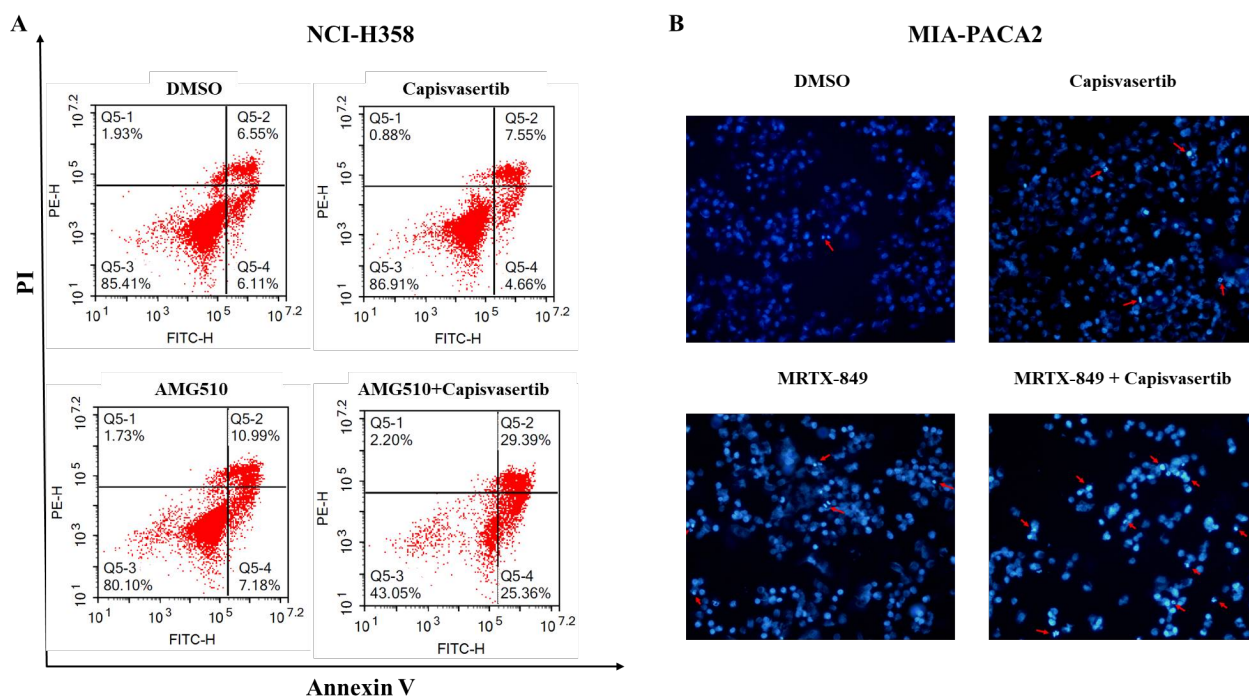


图 6 Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂联用促进肿瘤细胞凋亡

Fig. 6 The combination of Capivasertib and KRAS G12C inhibitor promotes apoptosis of tumor cells

3.7 联用增强对肿瘤细胞克隆形成的抑制

为进一步验证药物联用的生物学效应，采用克隆形成实验，验证联用方案对肿瘤细胞的增殖的抑制作用。将 SW1463、NCI-H358 细胞铺板，分别加入 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Capivasertib 以及 $5\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MRTX849 或 $10\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AMG510，对照组加入 DMSO，培养 2 到 3 天后，用结晶紫染色处理分析，结果如图七。

结果分析表明，在 NCI-H358 细胞中，

Capivasertib 单药处理的克隆形成率是 32.2%，AMG510 和 MRTX849 单药处理是 2.8%和 3.7%，当和 Capivasertib 联用时克隆形成率是 0.05%和 0.36%。在 SW1463 细胞中，Capivasertib 单药处理的克隆形成率是 65.3%，AMG510 和 MRTX849 单药处理是 35.9%和 35.6%，当和 Capivasertib 联用时克隆形成率是 15.0%和 17.8%。以上结果表明，Capivasertib 联用 KRAS G12C 抑制剂可以显著增强对肿瘤细胞克隆形成的抑制。

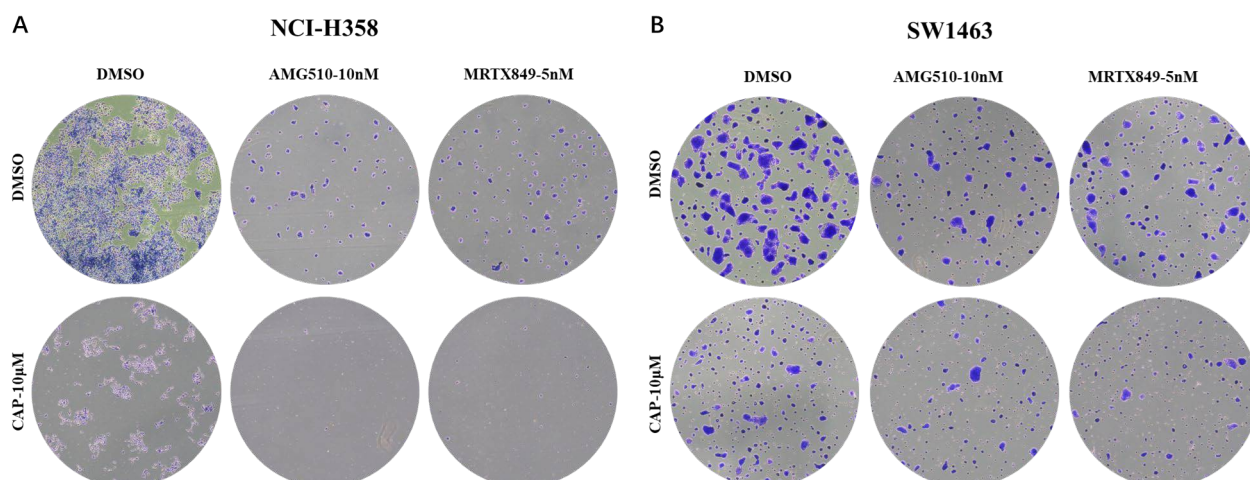


图 7 Capivasertib 与 KRAS G12C 抑制剂联用协同抑制克隆形成

Fig. 7 Capivasertib collaboratively inhibits clonal formation in combination with KRAS G12C inhibitor

4 讨论

本研究开展 AKT 抑制剂 Capivasertib 和 KRAS 抑制剂 AMG510/MRTX849 的联用研究, 考察对 KRAS G12C 突变肿瘤细胞的影响。结果显示, 在含 KRAS G12C 突变的非小细胞肺癌 NCI-H358、胰腺癌 MIA-PACA2、结直肠癌 SW1463 等肿瘤细胞系中都体现出良好的协同作用, 通过抑制抗凋亡蛋白 BCL-xl 和 BCL-2 的表达, 诱导 G1 期阻滞, 促进凋亡的发生, 显著抑制细胞增殖。

上述研究提供了 KRAS G12C 抑制剂和 AKT 抑制剂联用治疗的新证据, 为未来的临床应用和基础研究奠定基础, 继续探索上述联合治疗的详细机制和临床应用前景, 将有助于优化 KRAS G12C 突变相关肿瘤的治疗方案, 提高患者的生存率。

REFERENCES

- [1] HUANG L, GUO Z, WANG F, et al. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2021, 6(1): 386.
- [2] THEIN K Z, BITER A B, HONG D S. Therapeutics Targeting Mutant KRAS [J]. Annual review of medicine, 2021, 72: 349-64.
- [3] KIM D, XUE J Y, LITO P. Targeting KRAS(G12C): From Inhibitory Mechanism to Modulation of Antitumor Effects in Patients [J]. Cell, 2020, 183(4): 850-9.
- [4] ARBOUR K C, RIZVI H, PLODKOWSKI A J, et al. Treatment Outcomes and Clinical Characteristics of Patients with KRAS-G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2021, 27(8): 2209-15.
- [5] AKHAVE N S, BITER A B, HONG D S. Mechanisms of Resistance to KRAS(G12C)-Targeted Therapy [J]. Cancer discovery, 2021, 11(6): 1345-52.
- [6] PAI E F, KABSCH W, KRENGEL U, et al. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation [J]. Nature, 1989, 341(6239): 209-14.
- [7] COX A D, FESIK S W, KIMMELMAN A C, et al. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? [J]. Nature reviews Drug discovery, 2014, 13(11): 828-51.
- [8] ANMAN B A, ALLEN J R, ALLEN J G, et al. Discovery of a Covalent Inhibitor of KRAS(G12C) (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors [J]. Journal of medicinal chemistry, 2020, 63(1): 52-65.
- [9] RYAN M B, FECE DE LA CRUZ F, PHAT S, et al. Vertical Pathway Inhibition Overcomes Adaptive Feedback Resistance to KRAS(G12C) Inhibition [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2020, 26(7): 1633-43.
- [10] JIAO D, YANG S. Overcoming Resistance to Drugs Targeting KRAS(G12C) Mutation [J]. Innovation (Cambridge (Mass)), 2020, 1(2).
- [11] HALLIN J, ENGSTROM L D, 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 discovery, 2020, 10(1): 54-71.
- [12] ZHAO Y, MURCIANO-GOROFF Y R, XUE J Y, et al. Diverse alterations associated with resistance to KRAS(G12C) inhibition [J]. Nature, 2021, 599(7886): 679-83.
- [13] YAEGER R, UBOHA N V, PELSTER M S, et al. Efficacy and Safety of Adagrasib plus Cetuximab in Patients with KRASG12C-Mutated Metastatic Colorectal Cancer [J]. Cancer discovery, 2024, 14(6): 982-93.
- [14] WEISS A, LORTHIOIS E, BARYS L, et al. Discovery, Preclinical Characterization, and Early Clinical Activity of JDQ443, a Structurally Novel, Potent, and Selective Covalent Oral Inhibitor of KRASG12C [J]. Cancer discovery, 2022, 12(6): 1500-17.
- [15] ZHENG Y, LIU Y, ZHANG F, et al. Radiation combined with KRAS-MEK inhibitors enhances anticancer immunity in KRAS-mutated tumor models [J]. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine, 2023, 252: 79-90.
- [16] Frontline Promise for Adagrasib-Pembrolizumab Combination [J]. Cancer discovery, 2023, 13(2): Of2.
- [17] DE LANGEN A J, JOHNSON M L, MAZIERES J, et al. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRAS(G12C) mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet (London, England), 2023, 401(10378): 733-46.
- [18] 赵璐, 许佳豪, 张玲. 人参皂昔抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(14): 2016-2022.
- [19] BROWN J S, BANERJI U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments [J]. Pharmacology & therapeutics, 2017, 172: 101-15.
- [20] 郑琳, 代晓阳, 张燕, 等. 新型 AKT 抑制剂 Hu7691 对胃癌细胞的抗肿瘤活性及机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(16): 1921-1927.
- [21] LINDSLEY C W. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation: a 2009 update [J]. Current topics in medicinal chemistry, 2010, 10(4): 458-77.
- [22] TURNER N C, OLIVEIRA M, HOWELL S J, et al. Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer [J]. The New England journal of medicine, 2023, 388(22): 2058-70.
- [23] SWEENEY C, BRACARDA S, STERNBERG C N, et al. Ipatasertib plus abiraterone and prednisolone in metastatic castration-resistant prostate cancer (IPATential150): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial [J]. Lancet (London, England), 2021, 398(10295): 131-42.
- [24] UKO N E, GÜNER O F, MATESIC D F, et al. Akt Pathway Inhibitors [J]. Current topics in medicinal chemistry, 2020, 20(10): 883-900.
- [25] MONTENEGRO M F, MARTÍ-DAZ R, NAVARRO A, et al. Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy [J]. Cell death & disease, 2023, 14(11): 761.
- [26] TUFAIL M, WAN W D, JIANG C, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling to overcome drug resistance in cancer [J]. Chemico-biological interactions, 2024, 396: 111055.
- [27] CHEN C, JIANG Y P, YOU I, et al. Down-regulation of AKT proteins slows the growth of mutant-KRAS pancreatic tumors [J]. bioRxiv : the preprint server for biology, 2024.