

На правах рукописи

Козина Мария Тимофеевна

**Поиск новых АКТ-ингибиторов: Роль белка Vex 1 в действии комбинации
новых стерических ингибиторов АКТ (протеинкиназы В) в сочетании с
Иматиниб Мезилатом на клетки гастроинтестинальной стромальной опухоли**

14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

(медицинские науки)

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования “Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова” Министерства здравоохранения Российской Федерации в сотрудничестве с Онкологическим Центром Фокс Чейза, Филадельфия, США (Fox Chase Cancer Center).

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Шимановский Николай Львович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Яворский Александр Николаевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория экспериментальной биомедицины, главный научный сотрудник

Доктор медицинских наук, профессор

Образцов Николай Владимирович

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Академия постдипломного образования, кафедра токсикологии и клинической фармакологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «____» _____ 2021 г. в ____ час. на заседании Диссертационного Совета Д208.072.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан «____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор



Духанин Александр Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО) – раковое заболевание желудочно-кишечного тракта, вызываемое в 85% процентах случаев мутацией тирозин-киназного рецептора KIT (CD117) или PDGFRa (5-8% пациентов)[Rammohan и др., 2013]. Эти мутации приводят к появлению константно активированных рецепторов, локализованных в плазматической мембране на поверхности клеток, что приводит к гиперпролиферации клеток и формированию опухоли. ГИСО является наиболее распространенным видом сарком в ЖКТ, наиболее часто поражая желудок (60% случаев) и тонкий кишечник (30%), толстый кишечник/прямую кишку (5%) [Charville, Longacre, 2017]. В РФ ежегодно диагностируют приблизительно 2000-2500 случаев с медианой возраста 60-65 лет [Орлова, Кащенко, Глузман, 2019]. Лечение этого вида опухоли предполагает хирургическое удаление самой опухоли и ее метастазов, в тех случаях, когда это возможно, а также неоадьювантную и адьювантную терапию таргетными ингибиторами мутированных тирозин-киназных рецепторов [Sankhala, 2017].

Для лекарственной терапии ГИСО одобрено пять препаратов ингибиторов тирозинкиназных рецепторов. ИМ, одобренный в 2001 году, является препаратом первой линии терапии уже в течение двадцати лет [Lostes-Bardaji и др., 2021]. Он селективно ингибирует мутантный KIT рецептор, что позволяет контролировать динамику опухолевого процесса в течение нескольких лет с минимальными побочными эффектами для пациента [Blanke и др., 2008; Demetri и др., 2002; Eisenberg, Trent, 2011; Jakob, Hohenberger, 2018; Tuveson и др., 2001]. Однако, резистентность к ИМ развивается в течение двух лет после начала терапии [Patel, 2013]. Препараты второй и третьей линий (сунитиниб, регорафениб) назначают после того, как развивается резистентность к ИМ, однако они предоставляют дополнительную стабилизацию размера опухоли на период от месяца до полугода [Demetri и др., 2006; Demetri и др., 2013]. Пока еще нет достаточных данных о скорости развития резистентности к препарату четвертой линии, рипретинибу [Falkenhorst, Hamacher, Bauer, 2019; Nemunaitis и др., 2019]. ИМ обладает наибольшей избирательностью к мутантному рецептору KIT, по сравнению с остальными линиями терапии, имеет меньшее токсическое воздействие на организм пациентов и оказывает наиболее продолжительный эффект среди всех доступных препаратов, поэтому вопрос предотвращения развития резистентности, или отсрочка развития резистентности, представляет огромную практическую значимость. Одна из стратегий в этом

направлении состоит в комбинировании ИМ с другими ингибиторами киназ или химиотерапевтическими агентами [Bosbach и др., 2017; Floris и др., 2013; García-Valverde и др., 2020; Looy Van и др., 2014]. В настоящее время в отечественной и зарубежной практике нет ни одного одобренного способа лечения ГИСО с помощью комбинации препаратов.

Степень разработанности темы

Известно, что АКТ киназа часто активируется в ИМ-резистентном ГИСО, а также может играть роль в развитии резистентности [Bauer и др., 2007; Ihle и др., 2015; Li и др., 2015; Quattrone и др., 2014; Zook и др., 2017]. Было показано, что в ИМ-чувствительных ГИСО комбинирование ИМ и ингибитора АКТ приводит к лучшей стабилизации размера опухоли [Zook и др., 2017]. Особенный практический интерес представляет изучение эффекта комбинации АКТ-ингибиторов и ИМ в ИМ-резистентных ГИСО, однако на настоящий момент таких исследований опубликовано не было. Кроме того, научный интерес представляет изучение молекулярных механизмов, обеспечивающих более высокую эффективность лечения комбинацией ингибиторов по сравнению со стандартной терапией ИМ, поскольку такие исследования могут пролить свет на новые потенциальные мишени для фармакотерапии. Опубликованные данные показывают, что экспрессия белка Bcl-2 увеличивается в клетках ГИСО в ответ на лечение комбинацией АКТ ингибитора и ИМ [Zook и др., 2017]. Роль этого белка в реакции ГИСО на терапию никогда не была описана, однако, некоторые литературные данные указывают на возможное взаимодействие между Bcl-2 и анти-апоптотическим белком Bcl-2 [Lindblad и др., 2015; Xiao и др., 2014]. Соединения ARQ092 и ARQ751 являются новыми селективными стерическими АКТ ингибиторами первого и второго поколения, соответственно [Yu и др., 2015]. Они обладают большей селективностью, чем их предшественник МК-2206, ранее использованный в экспериментах с ГИСО. Оба новых ингибитора никогда ранее не исследовались в целях терапии ГИСО.

Цель исследования

Целью данной работы является исследование эффективности применения комбинации новых стерических АКТ-ингибиторов (ARQ092 и ARQ751) и Иматиниба Мезилата при лечении ГИСО, а также выявление молекулярного механизма действия этой комбинации.

Задачи исследования

1. Определить эффективность ингибирования патогенетических звеньев внутриклеточного каскада вторичных мессенджеров и цитотоксическую активность на клеточных линиях ГИСО при использовании каждого ингибитора в отдельности и комбинации, определить синергизм.
2. Разработать новую ксенографтную модель ГИСО с первичной устойчивостью к ИМ.

3. Исследовать эффективность и цитотоксичность заявленных комбинаций на моделях *in vivo* с разными типами чувствительности к ИМ (первичная чувствительность, первичная резистентность, приобретенная резистентность); сравнить эффективность обоих АКТ ингибиторов;

4. Исследовать изменение уровня экспрессии белка Vex1 в ходе лечения; определить белки-партнеры Vex1 и механизм его участия в молекулярном механизме действия ингибиторов;

5. Определить возможный молекулярный механизм действия новой комбинации, помимо белка Vex1.

6. Оценить потенциальную применимость АКТ ингибиторов, для использования в терапии “дикого типа” и PDGFRa – мутантных подтипов ГИСО.

Научная новизна

В данной научно-исследовательской работе впервые описан эффект АКТ ингибиторов в качестве монотерапии и в сочетании с ИМ на рост опухолей ГИСО в моделях *in vivo*, имеющих первичную и приобретенную резистентность к ИМ. Новые селективные стерические АКТ ингибиторы первого и второго поколения, ARQ092 и ARQ751, были впервые исследованы в контексте ГИСО. Впервые методом прямой ксенотрансплантации получена *in vivo* новая модель ГИСО, клетки которой несут первичную ИМ-резистентную мутацию гена KIT в экзоне 9, встречающуюся у 10-15% пациентов. В ходе экспериментов впервые выполнен скрининг партнеров по взаимодействию белка Vex1 в живых клетках методом биотиновой идентификации (BioID); выявлены признаки взаимодействия с супрессором апоптоза Bcl-XL. Опровергнуто предположение о критической роли экспрессии Vex1 в ответе опухолей на лечение комбинацией ИМ и АКТ ингибитора.

Анализ дифференциальной экспрессии белков в результате обработки комбинацией ингибиторов АКТ и ИМ методом масс спектрометрии белковых лизатов выявил значительную сверхэкспрессию белка PDCD4 при лечении комбинацией по сравнению с монологением. В данной работе мы подтвердили ассоциацию восстановления экспрессии PDCD4 в ГИСО с апоптозом и остановкой клеточного цикла. Активация киназ, на ингибировании которых основано это исследование (АКТ1, АКТ2, АКТ3), была подтверждена методом киномного профилирования в образцах опухолей ГИСО разных подтипов (“дикий тип”, PDGFRa- и KIT-мутантные) Это первое киомное профилирование ГИСО опухолей, которое может облегчить поиск новых мишеней для таргетной терапии всех подтипов ГИСО в будущем.

Научно-практическая значимость работы

На основании полученных результатов доклинического исследования АКТ ингибиторов и их сочетаний с ИМ на рост опухолей ГИСО в моделях *in vivo*, имеющих первичную и приобретенную

резистентность к ИМ было получено разрешение на проведение клинических испытаний АКТ ингибитора ARQ092 в комбинации с иммунотерапией PD1 ингибитором у больных с ГИСО. Оба исследованных ингибитора продемонстрировали синергизм *in vitro* в отношении выживаемости клеток ГИСО. Новая разработанная ксенографтная модель в настоящее время используется в нескольких доклинических исследованиях в Онкологическом Центре Фокс Чейза, а также будет доступна для исследователей из других исследовательских институтов после публикации этой диссертации. Полученная положительная динамика дает обоснования для доклинического (и клинического) исследования АКТ-ингибиторов в сочетании с новым ингибитором KIT, рипретинибом (он не был одобрен на момент проведения нашего исследования). Значительную роль в действии комбинации АКТ-ингибитора и ИМ по результатам представленной работы играет PDCD4, этот белок вовлечен в регуляцию клеточного цикла и апоптоза. Эти данные указывают на целесообразность исследований ингибиторов АКТ в комбинации с химиотерапевтическими препаратами, регулирующими эти процессы, например ингибитором регулятора клеточного цикла Wee1. Данное исследование опровергло предположение о роли Bcl-XL в ответе на комбинацию АКТ ингибитора, однако выявили его взаимодействие и, возможно, секвестрацию анти-апоптотического фактора Bcl-XL. Эти данные могут оказаться критически важными для изучения лейкозов и глиом, а также других онкологических заболеваний головного мозга, где Bcl-XL экспрессируется на высоком уровне. Киномное профилирование и масс спектрометрия указывают на возможность и обоснованность использования АКТ ингибиторов для лечения различных подтипов ГИСО, помимо использованных в этой работе KIT-мутантных опухолей. Кроме того, полученный экспериментальный опыт и новые сведения о молекулярных процессах вовлеченный в действие таргетной терапии внедрен в преподавательскую практику на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии МБФ ФГОУ ВО РНИМУ.

Методология и методы исследования

Исследование включало постановку опытов *in vivo* и *in vitro*. Определения летальных доз и определение синергизма (через определение комбинаторного индекса) проводилось *in vitro* на трех различных клеточных линиях ГИСО, имеющих разные степени чувствительности к ИМ. Молекулярно-биологическое исследование механизма действия новых ингибиторов проводилось с использованием временной трансфекции, ингибирования экспрессии генов с помощью миРНК, иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции. Исследования изменений в протеоме проводилось с использованием BioID, профилирования кинома и тотального протеома методом масс-спектрометрии. Все *in vitro* эксперименты проводились минимум в трех биологических повторностях. Для определения эффективности новых ингибиторов были использованы мыши

линий CB.17/SCID и NSG-SGM3 с привитыми ксенографтными опухолями с разной чувствительностью к ИМ. Лекарственные вещества вводились внутривенно. Регистрация размера опухолевых узлов в динамике производилась с помощью штангенциркуля дважды в неделю.

Положения, выносимые на защиту

1. Оба ингибитора АКТ (ARQ092 и ARQ751) эффективно ингибируют звенья патогенетически активированного сигнального каскада PI3K/АКТ/MAPK в клетках ГИСО *in vitro* в терапевтических концентрациях (до 3 мкМ). Цитотоксическая активность обоих новых ингибиторов АКТ (ARQ092 и ARQ751) в виде монотерапии практически не превышает эффективности ИМ *in vitro* в трех различных линиях клеток ГИСО с разной чувствительностью к ИМ.

2. Разработана новая ксенографтная модель ГИСО с первичной резистентностью к лечению ИМ; модель успешно перенесла многократные пассажы новым мышам; опухоль имеет мутацию экзона 9 рецептора KIT, подобные мутации встречаются у 15% пациентов с ГИСО.

3. Эффективность заявленных комбинаций ингибиторов АКТ (ARQ092 и ARQ751) и ИМ протестирована на моделях с разными типами чувствительности к ИМ (первичная чувствительность, приобретенная резистентность и новая модель с первичной резистентностью).. Комбинация АКТ ингибиторов с ИМ в моделях вторичной и первичной устойчивости к ИМ не дала статистически значимого улучшения по сравнению с монотерапией ИМ, однако имела место тенденция к стабилизации размера опухоли.

4. Экспрессия гена *Vex1* при обработке клеток ингибиторами АКТ и ИМ воспроизводимо увеличивалась, однако, это проявлялось только на уровне мРНК во всех модельных линиях клеток. Эндогенного белка *Vex1* в клетках не обнаружено. Подавление экспрессии гена *Vex1* уменьшало выживаемость клеток, но не затрагивало реакцию на обработку ингибиторами.

5. Скрининг на изменения, вызванные обработкой ИМ и ингибиторами АКТ, в тотальном протеоме ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеток, позволил выявить увеличение уровня белка PDCD4, который активирует ингибитор клеточного цикла p27 и апоптоз, а также инактивацию транскрипционного фактора Elk1 и падение уровня экспрессии его мишеней.

6. С помощью киномного профилирования обнаружена активация АКТ не только в KIT-мутантных, но и в других типах ГИСО: “дикого типа” и PDGFRa – мутантных. Комбинация АКТ ингибитора с ИМ не позволяет преодолеть резистентность к ИМ, обусловленную стерической мутацией KIT рецептора, но полученные данные, указывают на целесообразность комбинирования АКТ-ингибиторов с новыми ингибиторами рецепторных киназ, рипретинибом и авапритинибом (в PDGFRa-мутантном подтипе ГИСО).

Степень достоверности

Работа проводилась в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. В качестве биологического объекта для экспериментальных исследований использованы линейные лабораторные животные, а также культуры опухолевых клеток, полученные из сертифицированных питомников. Содержание, хранение, культивирование и все манипуляции с биологическими объектами выполнялись в строгом соответствии с требованиями национального законодательства и иных регулирующих нормативно-правовых актов. Лекарственные вещества приобретались у официальных дистрибуторов.

Апробация результатов

Апробация результатов диссертации проведена на заседании кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им.Н.И. Пирогова Минздрава России, протокол №1 от 20.04.2021 г. Основные результаты исследований были представлены на 21-ой, 23-ей, 24ой-ей и 25-ой ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Фокс Чейзовского Онкологического центра (Филадельфия, США, 2016-2021); Симпозиуме по поиску новых лекарств Медицинской Школы имени Льюиса Каца университета Тэмпл (Филадельфия, США, 2017); на международной ежегодной конференции по Американской ассоциации по исследованию рака (Чикаго, США, 2018); на международной конференции Общества по изучению раков соединительной ткани (Гавайи, США, 2017), VI-ой конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, 2020).

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационной работы было опубликовано 5 научных работ, среди которых 2 публикации в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК; 1 тезисы в журнале, соответствующем требованиям ВАК и 1 тезисы, индексируемые системой РИНЦ.

Личный вклад автора

Идея выполнения настоящей работы принадлежит М.Т. Козиновой. Автор диссертации самостоятельно сформулировала цели и задачи работы, разработала ее план и дизайн, обобщила зарубежный и отечественный литературный материал и написала литературный обзор. Ею были поставлены эксперименты по эффективности новых ингибиторов и молекулярно-биологических механизмов эффективности, проанализированы данные и подготовлены публикации.

Объём и структура работы

Диссертация написана в соответствии с требованиями к рукописям диссертационных работ, включает введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования,

использованных в работе. Раздел собственных результатов изложен в шести главах. В заключении отражены перспективы дальнейшего развития темы, сформулированы выводы и практические рекомендации. Диссертация изложена на 139 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью шестью рисунками и семью таблицами. Библиографический список содержит 177 источников, из которых 6 отечественных и 171 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

Основным объектом исследования являются новые стерические АКТ-ингибиторы ARQ092 и ARQ751, а так же ингибитор рецептора KIT ИМ. Эксперименты *in vitro* проводились на культурах клеток ГИСО чувствительных и резистентных к ИМ. Антитела были приобретены у Cell Signaling Technologies, Sigma, Santa Cruz Biothechnology и GE Healthcare. Эксперименты *in vivo* проводились с использованием мышей линий: CB.17/SCID и NSG-SGM3.

Анализ жизнеспособности клеток и синергии ингибиторов *in vitro*

Жизнеспособность клеток измеряли через 72 часа после обработки ингибиторами, используя анализ жизнеспособности Cell Titer Blue. Синергизм между ингибиторами АКТ и ИМ оценивали с помощью метода комбинированного индекса Чоу-Талалай, как описано ранее [Ye и др., 2021]

Приготовление экстракта из клеток и анализы иммуноблоттинга

Для иммуноблоттинга клетки культивировали в среде с ингибиторами и лизировали по стандартному протоколу. Для раздельной экстракции цитоплазматических и ядерных белков, клетки собирались трипсинизированием, клеточные осадки инкубировались с лизирующим буфером. После центрифугирования супернатант, содержащий цитоплазматический экстракт отбирался отдельно. Ядерный осадок лизировали повторно. Концентрацию белка измеряли колориметрически. Белки разделяли электрофоретически и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Блокировку и инкубацию с антителами производили по протоколу производителя. Детекцию осуществляли на автордиографической плёнке.

Высокоэффективная жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия

Высокоэффективная жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия (ВЭЖХ МС/МС) использовалась в трех вариациях. Для метод анализа кинема (MIB/MS) использовалась предварительное обогащение образцов киназами за счет преинкубации образцов с гранулами,

содержащими киназные ингибиторы, с последующим элюированием связавшихся киназ, и затем подвергались ВЭЖХ МС/МС, аналогично с анализом общего протеомного состава.

BioID скрининг на белок-белковые взаимодействия включал модификацию белка Vex1 добавлением к его структуре биотин лигазы BirA. Клетки модифицированные такой конструкцией инкубировали с или без ингибиторов и в присутствии биотина в течении 20ч. Биотинилизированные потенциальные белки-партнеры по взаимодействию исследуемого белка Vex1 выделялись на гранулах со стрептавидином и затем подвергались ВЭЖХ МС/МС, аналогично с анализом общего протеомного состава. Киномные и BioID образцы, так же как и цельноклеточные белковые лизаты подвергались трипсинизированию на короткие пептиды, стандартной пробоподготовке и хроматографическому разделению, а затем элюированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрии. Анализ данных проводился с использованием MaxQuant, Tibco и Perseus. Биоинформатический анализ на обогащение функциональными группами проводился с использованием Metascape и GSEA.

Иммунофлуоресценция

Клетки трансфицировали указанными векторами. Клетки фиксировали параформальдегидом, инкубировали с пермебиализирующим и блокирующим буферами. Окрашивание первичными, а затем вторичными флуоресцентными антителами проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. Ядра окрашивали DAPI. Микроскопировали с помощью флуоресцентного микроскопа AMG Evos.

Трансфекция миРНК

Коммерческие смеси миРНК N-TARGETplus SMARTpool были использованы для трансфекции клеток согласно протоколу производителя.

Количественный анализ ПЦР в реальном времени (кПЦР)

Эффективность подавления экспрессии миРНК подтверждали с помощью кПЦР с использованием проб TaqMan согласно протоколу производителя. Дифференциальная экспрессия рассчитывалась по стандартной формуле ddCt.

Прививаемые подкожные ксенографтные опухоли

Все исследования с участием животных проводили в соответствии с процедурами, утвержденными Комитетом по уходу и использованию животных Фокс Чейзовского Онкологического Центра. Для эксперимента *in vivo* были использованы клеточные линии GIST-T1 и GIST-430, впервые разработанная линия перевиваемых опухолей PDX9.1, а также мыши линии CB.17/SCID, NSG-SGM3. Клеточную суспензию или измельченную ткань смешивали с матриксом

Corning Matrigel (соотношение 1:1) и вводили подкожно анестезированным лабораторным животным. Животные были рандомизированы на подгруппы, содержащие 8 — 10 животных, для тестирования ингибиторов. Размеры опухолей измеряли дважды в неделю. ИМ, ARQ092 и ARQ751 вводились мышам путём внутрижелудочного введения раствора препарата в суммарном объёме 100 мкл (дозировки и указаны в Таблице 1). По достижению опухоли размера в 10% от массы тела мышей Животных выводили из эксперимента вдыхаемым CO₂. Опухоли собирали и замораживали в сухом льду.

Таблица 1. Дозировки изучаемых веществ, вводимые различным подгруппам мышей.

Подгруппа (Действующее вещество)	Дозировка, мг/кг	Дней/неделю	Тип лабораторных животных (модель)
Контроль	-	5	SCID (T1, 430), NSG (PDX9.1)
ИМ	50	5	SCID (T1, 430), NSG (PDX9.1)
ARQ092	75	3	SCID (T1, 430)
ARQ751	25	4	SCID (T1, 430), NSG (PDX9.1)
ARQ092/ИМ	75/50	3/5	SCID (T1, 430)
ARQ751/ИМ	25/50	4/5	SCID (T1, 430), NSG (PDX9.1)
ARQ092	50	2	NSG (PDX9.1)
ARQ092/ИМ	50/50	4/5	NSG (PDX9.1)

Моделирование роста опухоли

Модель Гаусса с тождественной связью и авторегрессионной корреляционной структурой использовали для моделирования влияния лечения и времени на (логарифмированный) объем опухоли. Объем опухоли сравнивали между группами лечения с использованием двустороннего критерия Манна-Уитни с ошибкой I типа 5% пакетом geepack

Статистика

Все данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. Тест Уилкоксона использовался для выявления различий между парными данными. Данные экспрессии в живых клетках анализировали с использованием ANOVA для множественных апостериорных сравнений или t-теста с двумя образцами. Все тесты были двусторонними. Использовали ошибку I типа 5%. Если не указано иное, все эксперименты повторяли трижды. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 8, если не указано иное.

Иммуногистохимический анализ

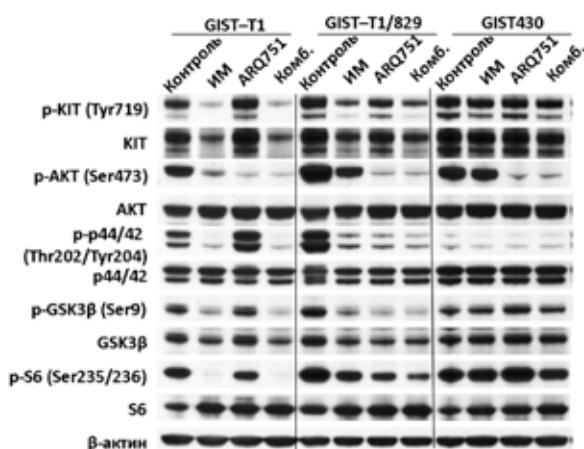
Опухолевые образцы фиксировались в растворе 4% параформальдегида. Срез ткани имел толщину 5мкм. Окрашивание первичными и вторичными антителами проходило по стандартному протоколу.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование пролиферативного сигналинга и цитотоксическая активность новых ингибиторов АКТ

В ходе выполнения работы два новых стерических АКТ ингибитора — ARQ092 (Мирансериб) и ARQ751 были протестированы *in vitro* на клеточных линиях ГИСО GIST-T1, GIST-T1/829, GIST430, имеющих различную чувствительность к ИМ. Ингибирование патогенетических звеньев внутриклеточного каскада вторичных мессенджеров PI3K/АКТ/MAPK при обработке клеток ГИСО стандартным терапевтическим ингибитором ИМ, одним из АКТ-ингибиторов и комбинацией ИМ и АКТ-ингибитора подтверждается иммуноблоттингом представленным на Рисунке 1.

А



Б

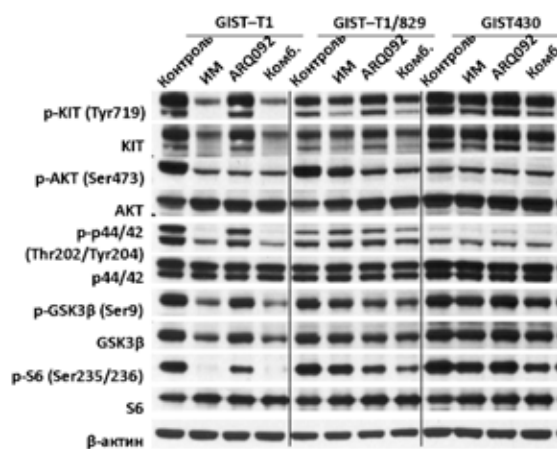


Рисунок 1. Комбинация АКТ ингибитора и ИМ ингибирует конститутивную активацию мишеней в сигнальном каскаде, активируемом рецептором KIT.

Иммуноблоттинг белковых лизатов из клеток линий GIST-T1, GIST-T1/829, GIST430, обработанных 1 мкМ ИМ, 3 мкМ АКТ ингибитора или комбинацией в течение шести часов. А – в качестве АКТ ингибитора использован ARQ751; Б – в качестве АКТ ингибитора использован ARQ092.

Цитотоксическая активность новых ингибиторов АКТ в виде монотерапии и комбинации с использованием панели ГИСО клеточных линий была протестирована *in vitro*. Графики выживаемости, приведенные на Рисунке 2, демонстрируют, что использование комбинации ингибиторов АКТ и ИМ может помочь преодолеть резистентность к ИМ у клеток линий ГИСО.

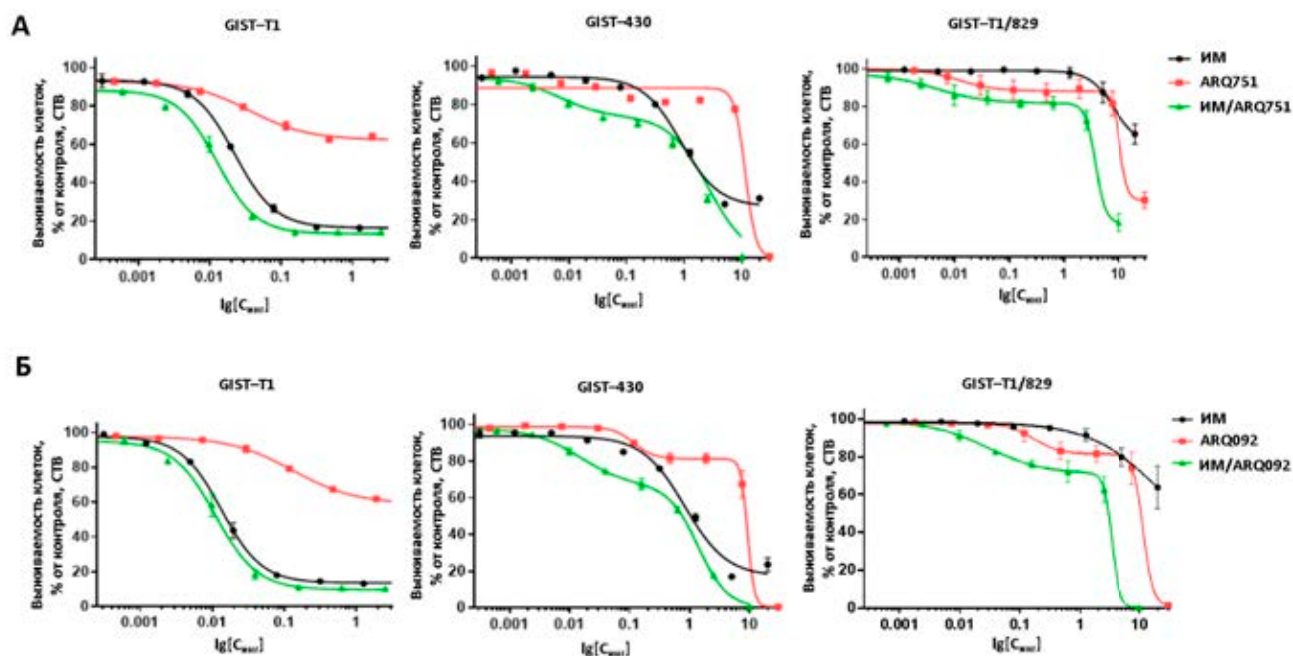


Рисунок 2. Комбинация АКТ ингибитора и ИМ ингибирует конститутивную активацию мишеней в сигнальном каскаде, активируемом рецептором KIT.

Выживаемость клеток линий GIST-T1, GIST-T1/829, GIST430, обработанных ИМ и АКТ ингибитором или их комбинацией в молярном соотношении 1:3 в широком диапазоне концентраций в течение 72 часов, по данным теста Cell Titer Blue. На графиках представлены нормализованные на среднее значения контроля интенсивности флуоресценции $\pm$ стандартная ошибка среднего. Концентрации приведены в виде десятичного логарифма концентрации ингибитора; для комбинации ингибиторов график построен по концентрации ИМ. Кривые восстановлены методом нелинейного регрессионного анализа с применением GraphPad Prism. А – в качестве АКТ ингибитора использован ARQ751; Б – в качестве АКТ ингибитора использован ARQ092.

По полученным кривым были получены величины IC₃₀ для каждого из типов обработки, синергизм между ИМ и каждым из АКТ ингибитором определяли по методу Чоу-Талалай. Значение комбинационного индекса <1 расценивали как синергизм. Комбинация обоих ингибиторов с ИМ проявила синергизм во всех использованных клеточных моделях (данные представлены Таблице 2).

Таблица 2. ИК₃₀ для комбинации ИМ:АКТ ингибитора в молярном соотношении 3:1		
Клеточная линия	<u>ИМ:ARQ751</u>	<u>ИМ:ARQ092</u>
GIST-T1	0.36 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.15
GIST-430	0.15 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.08
GIST-T1/829	0.70 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.02

В ходе выполнения работы была разработана новая ксенографтная модель ГИСО полученная из человеческой опухоли. Новая модель получила название PDX9.1. Она обладает первичной устойчивостью к лечению ИМ за счет мутации A502_503 duplication в 9 экзоне гена KIT. Образец ткани был приживлен лабораторным мышам и серийно перевивался. При каждом следующем

пассаже контролировали сохранение генетических и морфологических свойств опухоли. Для доклинического материал ГИСО прививался лабораторным животным, которые рандомизировались по экспериментальным группам и получали терапию ингибиторами перорально. В используемой дозировке у мышей не наблюдалось побочных эффектов и потери веса в ходе лечения. Результаты представлены в виде графиков зависимости размера опухолей от времени, прошедшего с начала лечения (Рисунок 3).

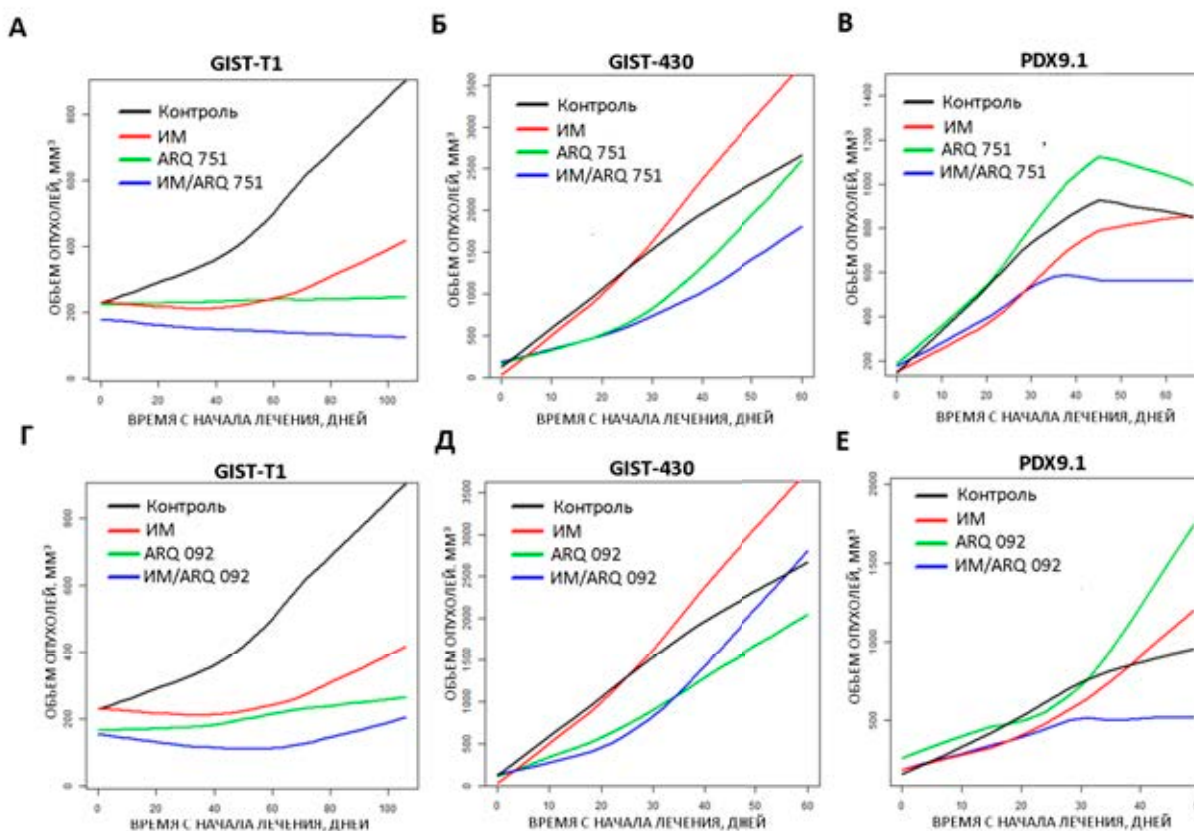


Рисунок 3. Кривые объёма привитых опухолей in vivo: чувствительные к ИМ GIST-T1 (А и Г), Б. Первично резистентные PDX9.1 (Б и Д), вторично резистентные GIST430 (В и Е). В каждой группе мыши получали лечение ингибиторами: контроль, ИМ, ARQ751 (А, Б, В), ARQ092 (Г, Д, Е), комбинация ИМ и АКТ ингибитора. Дозировки приведены в Таблице 1. Статистическая значимость отличий между кривыми рассчитывали по критерию Манна-Уитни ($p < 0.0006$ для комбинаций ИМ и АКТ ингибиторов против монотерапии с ИМ в GIST-T1 ИМ-чувствительной модели, в других моделях статистической значимости не выявлено, что объясняется петлеобразной формой кривой, однако есть явный тренд к улучшенной стабилизации размера опухолей)

В данной работе мы сравнили эффективность использования первого и второго поколения АКТ ингибиторов по уменьшению размеров опухолей у модельных животных в условиях разнообразия чувствительностей к терапии, каковое наблюдается среди реальных пациентов (GIST-T1 модель – чувствительна к ИМ, GIST-430 – вторично резистентна, PDX9.1 – первично резистентна). Статистически значимый эффект был получен в ИМ-чувствительной модели при

сравнении комбинации ингибиторов со стандартной терапией, в остальных моделях комбинация имела тренд к лучшей стабилизации размера опухолей без статистической значительности.

Роль белка Vex1 в механизме действия комбинации АКТ ингибиторов и ИМ

Данные об изменении уровня экспрессии белка Vex1 после обработки клеток комбинацией ИМ и ARQ751, полученные с помощью кПЦР, представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Повышение экспрессии Vex1, вызываемое комбинацией ИМ + АКТ ингибитор (ARQ751)	
Клеточная линия	Отношение экспрессии Vex1 в условиях обработки комбинацией к контролю
GIST-T1	1.9 ± 0.9
GIST882	2.5 ± 0.5
GIST430	6.2 ± 2.7
GIST-T1/829	2.9 ± 1.2

Комбинация ингибиторов вызывала индукцию мРНК, в особенности среди ИМ-резистентных клеток. Чтобы исследовать молекулярную функцию белка Vex1 и определить его белки-партнеры по взаимодействию, были собраны векторы для протеомного скрининга BioID на белок-белковые взаимодействия. Идея скрининга заключается в прикреплении биотин-лигазы BirA к белку-мишени. Экспрессируясь в живых клетках, такой гибрид метит биотином все белковые молекулы, оказавшиеся в непосредственной близости от белка-мишени. На первом этапе скрининга необходимо проверить, что прикрепление биотинлигазы не нарушает естественного расположения белка-мишени в клетке.

На Рисунке 4 представлена упрощенная схема анализа данных. После нормализации и статистической обработки данные были визуализированы в качестве Volcano диаграмм сравнения между BioID и нетрансфицированным контролем. Группы белков так же были анализированы с помощью Metascape для поиска обогащения по функциональным группам или сигнальным каскадам

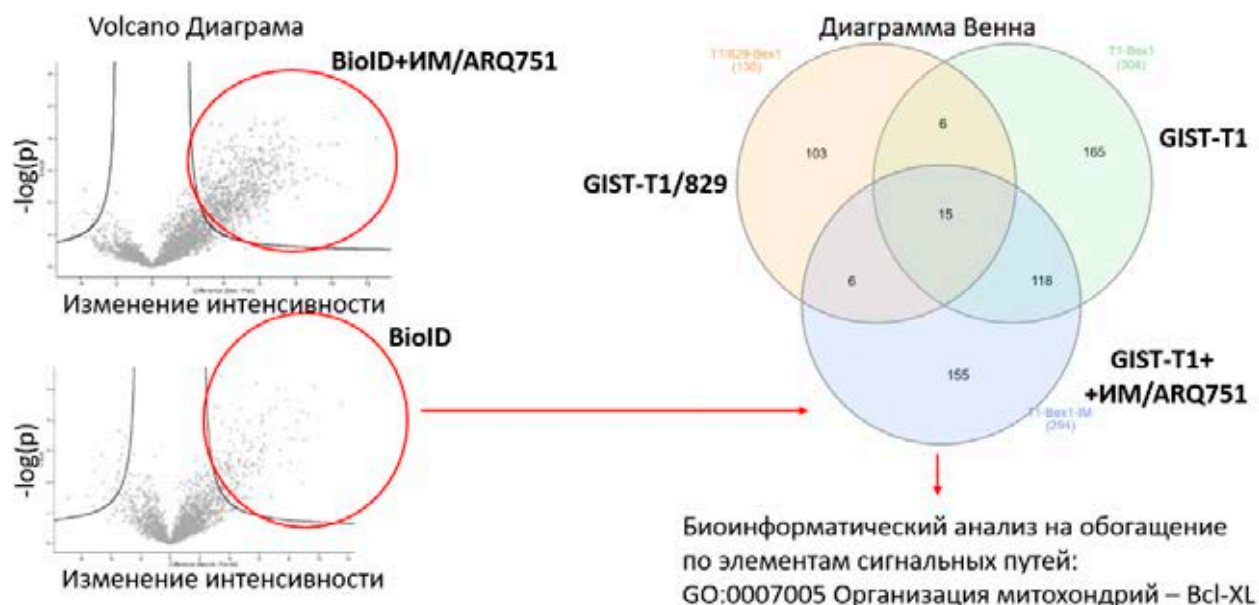


Рисунок 4. Схема анализа данных, полученных при BioID скрининге по взаимодействию с Bcl-XL.

Белки, интенсивность детекции которых наиболее значительно изменилась, судя по их расположению на диаграмме Volcano, сравнивали между образцами двух клеточных линий и обработки ингибиторами (ИМ/ARQ751, 20 часов) с помощью диаграммы Венна. Представленные группы белков анализировались с помощью инструмента Metascape, чтобы выявить обогащение функциональных групп и сигнальных путей. Белки, функция которых могла быть связана с какой-либо формой клеточной смерти, которые были описаны как характерные для ГИСО были отобраны для дальнейшей валидации. Основным кандидатом стал противоапоптотический белок Bcl-XL.

На основании некоторых литературных данных и функциональной кластеризации мы отобрали белки для валидации.

Валидация потенциальных белков-партнеров проводилась методом ко-иммунопреципитации. Все связавшиеся с Bcl-XL белки и наносили на иммуноблот по стандартному протоколу. На Рисунке 5, панель А, приведены результаты иммунопреципитации сверхэкспрессированного Bcl-XL. Вместе с этим белком ко-иммунопреципитировались три других белка (Mac2BP, RRM2B, Bcl-XL), однако только Bcl-XL демонстрировал явные изменения во взаимодействии с Bcl-XL в ответ на обработку комбинацией ингибиторов.

Панель Б на Рисунке 5 демонстрирует, что оба — сверхэкспрессированный Bcl-XL и Bcl-XL локализованы в ядре клеток ГИСО, что достаточно необычно для Bcl-XL и может указывать на потенциальную секвестрацию Bcl-XL белком Bcl-XL в ядре, которая не позволяет ему находиться в мембране митохондрии и играть там антиапоптотическую роль. Нам не удалось выделить на иммунопреципитации эндогенный Bcl-XL. Панель В на Рисунке 5 демонстрирует, что полоса близкого размера к Bcl-XL — это легкая цепь антител, использованных для иммунопреципитации. Данные для GIST-T1 не представлены, но они повторяют закономерность. Поскольку некоторые литературные

данные говорили в пользу того, что экспрессия эндогенного Bex1 может зависеть от активности протеасом, был проведен эксперимент по ингибированию протеасом.

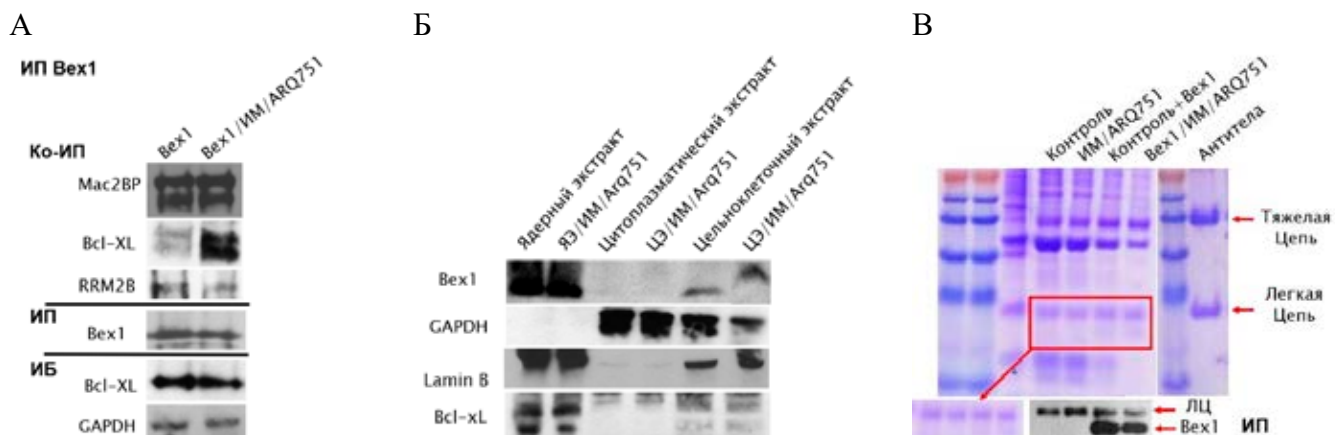


Рисунок 5. Результаты ко-иммунопреципитации потенциальных партнеров Bex1 по взаимодействию и валидация внутриклеточной локализации Bcl-XL. А. Иммунопреципитация (ИП) сверхэкспрессированного Bex1 в клетках линии GIST-T1/829; ко-иммунопреципитация (ко-ИП) выявила взаимодействие белков Mac2BP, RRM2B, Bcl-XL с Bex1; из всех этих партнеров только Bcl-XL демонстрирует заметное увеличение в ответ на обработку ингибиторами, хотя его общее количество в клетке не изменяется согласно данным иммуноблота (ИБ) лизатов использованных для ИП. Иммуноблот на GAPDH использован в качестве контроля на равномерное нанесение. Б. Иммуноблот экстрактов белков из ядра, цитоплазмы и цельных клеток линии GIST-T1/829 в условиях сверхэкспрессии Bex1 показывает, что Bex1 и Bcl-XL локализованы в ядрах клеток ГИСО; Lamin B и GAPDH использованы как маркеры качественного отделения ядер от цитоплазмы. В. Результаты иммунопреципитации Bex1 в клетках без и с сверхэкспрессией Bex1 показывают отсутствие эндогенного Bex1 в клетках GIST-T1/829; белковый гель, окрашенный по Кумасси и соответствующий иммуноблот окрашенный на Bex1 показывают, что полоса близкая по размеру к Bex1 (около 23кДа) является легкой цепью антител, использованных для иммунопреципитации (контрольный образец содержит только антитела).

Результаты представлены на Рисунке 6, панель А, маркером накопления недеградивавших белков является Nifla. Не смотря на успешное ингибирование деградации и даже на видимый эффект этого ингибирования на накопление сверхэкспрессированного Bex1, эндогенный Bex1 не был обнаружен. Согласно нашей первоначальной гипотезе, Bex1 мог играть важную роль в ответе на обработку ГИСО комбинацией ингибиторов АКТ и ИМ, в том числе за счет секвестрации антиапоптотического белка Bcl-XL. Мы подавили экспрессию обоих белков с помощью миРНК трансфекции (эффективность которой подтверждается на Рисунке 6, Б и Д).

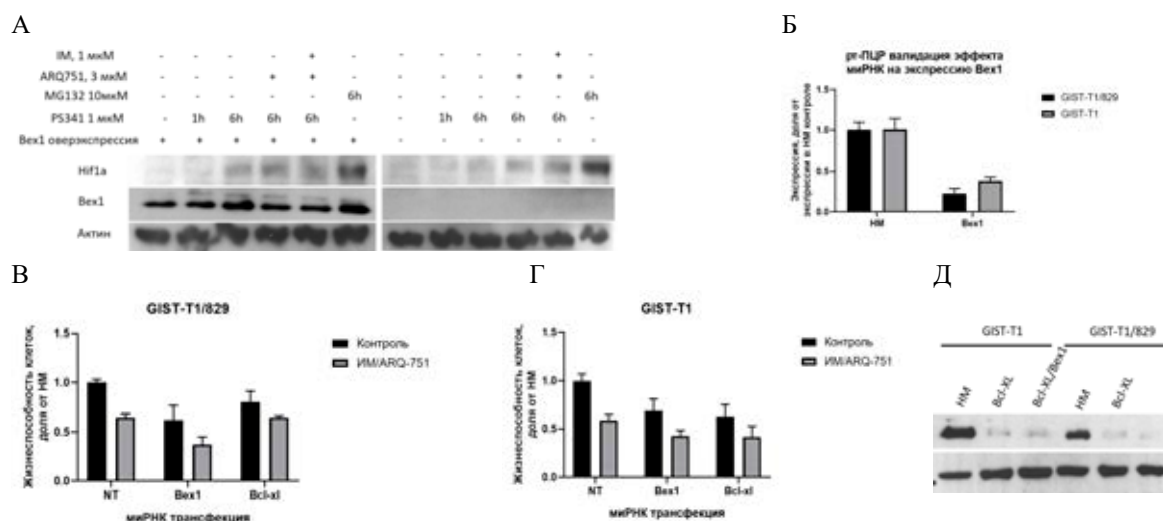


Рисунок 6. Эффект сверхэкспрессии и подавления экспрессии гена в клетках ГИСО.

А. Репрезентативный иммуноблот белковых лизатов, полученных из клеточной линии GIST-T1/829 с и без сверхэкспрессии Bex1, а так же с обработкой ингибиторами протеасомной деградации и комбинацией ИМ/ARQ751; протеасомные ингибиторы влияют на накопление сверхэкспрессированного белка, эндогенный Bex1 в клетках не детектируется; Hif1a окрашивание использовано в качестве маркера эффективного ингибирования протеасомной деградации. Б. Рт-ПЦР валидация эффективности подавления экспрессии Bex1 в клетках GIST-T1 и GIST-T1/829 с помощью миРНК трансфекции; HM – миРНК, у которой нет мишени, отрицательный контроль. В, Г. Эффект от подавления экспрессии Bex1 и Bcl-XL в клетках GIST-T1 и GIST-T1/829 с помощью миРНК трансфекции; видно, что хотя каждый из генов и важен для жизнеспособности клеток, подавление их экспрессии не меняет цитотоксической эффективности комбинации ИМ/ARQ751. Д. Иммуноблот-валидация эффективности подавления экспрессии Bcl-XL в клетках GIST-T1 и GIST-T1/829 с помощью миРНК трансфекции.

Жизнеспособность клеток линий в результате подавления экспрессии обоих генов упала, что говорит об их важной роли для жизнеспособности клеток. Однако, в результате лечения комбинацией ингибиторов жизнеспособность клеток падала еще больше, что говорит о том, что, по крайней мере, Bex1 не играет важной роли в молекулярном механизме действия этих двух ингибиторов.

Протеомные скрининги для выяснения молекулярного механизма действия АКТ ингибиторов и валидация их применимости для различных подтипов ГИСО

Скрининг изменений в тотальном протеоме клеток GIST-T1 и GIST-T1/829 подвергнутых 20-часовой обработке с комбинацией ИМ/ARQ751 и контрольных по результатам статистического анализа и визуализации типа Volcano диаграммы и анализа с помощью инструмента GSEA, выявил задействованные сигнальные каскады и определить транскрипционные регуляторы. Схема анализа представлена Рисунок 7.

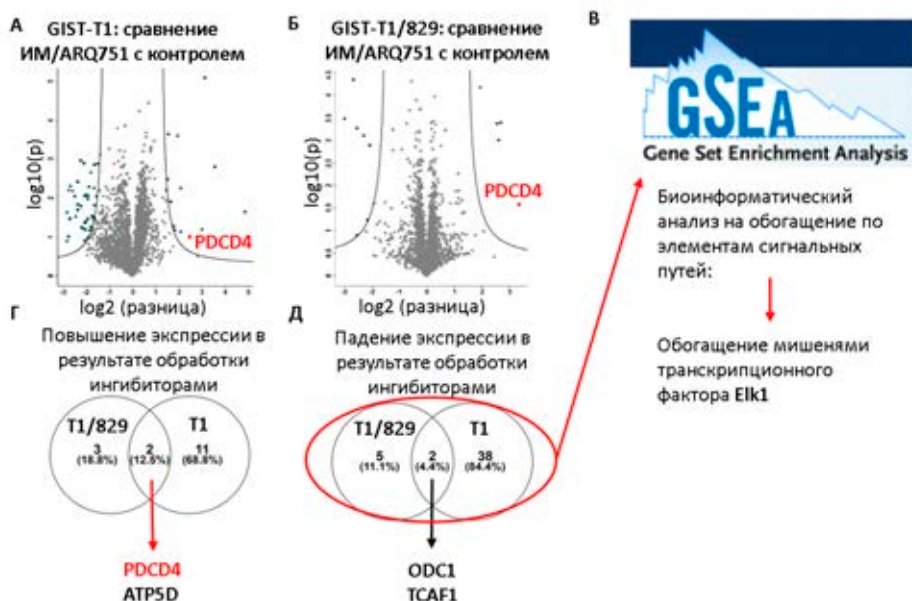


Рисунок 7. Анализ изменений в тотальных белках в клетках линий GIST-T1 и GIST-T1/829 после обработки комбинацией ИМ/ARQ751 в течение 20 часов. Белки, интенсивность регистрации которых на ВЭЖХ/МС изменилась наиболее значительно в клетках линий GIST-T1 и GIST-T1/829 (А, Б), были проанализированы с помощью инструмента GSEA, который выявил значительное изменение интенсивности генов-мишеней транскрипционного фактора Elk1 (В); экспрессия двух белков упала в обеих линиях в результате обработки ингибиторами - ODC1, TCAF1; экспрессия двух белков повысилась в обеих линиях в результате обработки ингибиторами - PDCD4, ATP5D.

Подробный перечень названий белков, интенсивность которых значительно изменилась **под воздействием комбинации ИМ/ARQ 751** в клетках ГИСО, представлен в Таблице 4.

Таблица 4. Белки, экспрессия которых статистически значимо изменилась под воздействием 20-часовой инкубации клеток ГИСО с комбинацией ингибиторов ИМ/ARQ 751					
GIST-T1				GIST-T1/829	
Белки, экспрессия которых уменьшилась после обработки ингибиторами					
ABCF2	FADS2	MKI67	SQLE	ASAH1	
ACACA	FBN1	NAV1	SQSTM1	ODC1	
AGFG1	HMGCS1	ODC1	TACC3	PTGS2	
ARMC9	HN1	PFN2	TAX1BP3	RAC2	
ATAD2	HSBP1	PRKCI	TCAF1	RPL35A	
BMP2K	IRF2BP2	PRRC2A	TGFB1I1	SPAG5	
CASP7	KIF11	RRM2	TPX2	TCAF1	
CBX1	KPNA2	SEC62	TYMS		
EIF1	LSM14B	SLC4A1AP	ZFYVE16		
EMC8	MAGT1	SPRY4	ZPR1		
Белки, экспрессия которых увеличилась после обработки ингибиторами					
ATP5D	H1FX	MRPL22	PBXIP1	ATP5D	NDUFAB1
BANF1	HIST1H1C	NDUFA4	PDCD4	HMGCR	PDCD4
DERL1	HIST1H4A	NDUFS4	TMEM109	ITM2C	
GSTM2					

Роль транскрипционного фактора Elk1

Анализ на функциональное обогащение выявил обогащение белками, экспрессия которых регулируется транскрипционным фактором Elk1. Среди этих белков были киназа BMP2K, элементы

каскада NfκB (CHUK) и регуляторы деградации самого рецептора KIT (Cbl). Несмотря, на то, что все эти данные выглядят очень интригующе в контексте молекулярной биологии ГИСО, литературные данные свидетельствуют о том, что это не может быть основным механизмом действия комбинации ИМ и ингибитора АКТ. Во-первых, инактивация Elk1 уже была описана ранее, как один из эффектов фармакологических веществ в отношении клеток ГИСО [Ochs и др., 2009; Yen и др., 2019]. Elk1 регулирует экспрессию генов мгновенной реакции на стресс (immediate early genes), и было показано, что его инактивация при лечении ИМ проходит в течение 24 – 48 часов [Bébién и др., 2003; Besnard и др., 2011; Kochan и др., 2014; Ochs и др., 2009]. Таким образом, в долгосрочном эффекте комбинации ИМ/ARQ751 эффект от Elk1 не может играть значительной роли. Кроме того, судя по нашим данным, инактивация Elk1 при лечении комбинацией ИМ/ARQ751 подавляется значительно сильнее по сравнению с ИМ в ИМ-резистентной модели (GIST-T1/829), в то время как в ИМ-чувствительной модели разницы в степени подавления функции Elk1 между ИМ и комбинацией не наблюдалось. Это наблюдение совершенно не коррелирует с тем фактом, что эффективность комбинации ингибиторов в ИМ-чувствительной модели значительно превышает таковую в ИМ-резистентной (как *in vitro*, так и *in vivo*).

Роль проапоптотического фактора PDCD4

Наше внимание привлек PDCD4, антиопухолевый фактор, активатор апоптоза и регулятор клеточного цикла, гиперэкспрессированный в обеих клеточных линиях. Литературные данные показывают, что ингибирование АКТ может приводить к увеличению уровня PDCD4 в раковых клетках, что в свою очередь вызывает повышение p27 – ингибитора клеточного цикла [Ozpolat и др., 2007; Wang и др., 2019; Wei и др., 2012]. На Рисунке 8 представлены результаты иммуноблоттинга: обработка клеток ГИСО в течение 20 часов ИМ в концентрациях, воспроизводящих условия протеомного скрининга, приводит к увеличению уровня PDCD4.

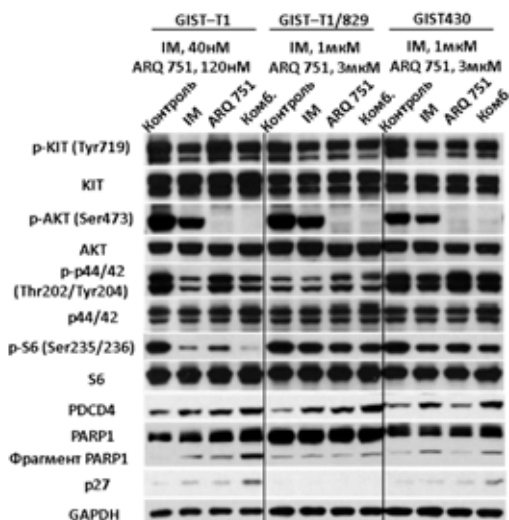


Рисунок 8. Валидация увеличения PDCD4 при обработке клеток комбинацией ИМ/ARQ751

Репрезентативный вестерн-блоттинг белковых лизатов, полученных из клеточных линий GIST-T1, GIST-T1/829, GIST-430, подвергнутых обработке комбинацией ИМ/ARQ751 в течение 20 часов; повышение PDCD4 вызывается обработкой комбинацией ингибиторов в большей мере, чем каждым ингибитором в отдельности; уровень PDCD4 коррелирует с расщеплением PARP1 и увеличением p27; GAPDH использован как контроль равномерной загрузки образцов в гель.

Двойное ингибирование вызывает значительно более сильное увеличение уровня PDCD4. Увеличение уровня фрагментированного PARP1 указывает на активацию апоптоза. Ожидаемо, наиболее сильная активация апоптоза наблюдается в ИМ-чувствительной модели, но тенденция к увеличению фрагментированного PARP1 наблюдается и в ИМ-резистентных линиях. Кроме того, в двух линиях из трех увеличение PDCD4 сопровождалось с увеличением уровня p27; таким образом, можно заключить, что из двух ИМ-резистентных линий, модель GIST-T1/829 является наименее чувствительной на молекулярном уровне к лечению комбинацией ИМ/ARQ751. На основании результатов иммуноблоттинга для дальнейшей валидации эффекта фармакологического одновременного ингибирования КИТ и АКТ на динамику клеточного цикла клеток ГИСО были выбраны клеточные линии GIST-T1 и GIST-430, для которых было подтверждено увеличение апоптоза и остановка клеточного цикла при обработке комбинацией ингибитора (результаты представлены в основном тексте диссертации).

Подтверждение наличия активации АКТ в различных подтипах ГИСО

Все проведенные эксперименты использовали модельные клетки и животных и КИТ-мутантного подтипа ГИСО, который составляет до 85% случаев этого вида онкологии.

Однако существуют еще два вида ГИСО, обусловленных другими причинами — PDGFRa мутантный подтип и ГИСО «Дикого типа» (Wild type), когда опухоль не имеет мутаций в КИТ или PDGFRa (но может иметь мутации в других генах). Для того, чтобы определить, может ли терапия АКТ ингибиторами в перспективе помочь пациентам с такими видами опухоли, мы провели еще один протеомный скрининг с использованием образцов опухолей, полученных от пациентов с различными типами ГИСО. «Тепловая карта» активности всех трех форм АКТ в образцах нормальной ткани желудка и трех подтипах ГИСО приведена в основном тексте диссертации. Наши данные показывают, что во всех типах ГИСО наблюдается активация АКТ, что может свидетельствовать о потенциальной применимости новых ингибиторов для лечения этих видов онкологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы

В работе была доказана эффективность обоих вышеописанных новых стерических ингибиторов пан-АКТ (ARQ092 и ARQ751) в комбинации с ИМ, стандартным лекарственным средством, одобренным для лечения гастроинтестинальной стромальной опухоли (ГИСО). Было установлен молекулярный механизм действия этой комбинации. Скрининг на изменение общего профиля белков (тотального протеома) позволил выявить накопление белка PDCD4, и последующую

остановку клеточного цикла и активацию апоптоза, как основной механизм эффективности комбинации изученных фармакологических ингибиторов. Эти данные нуждаются в дополнительном изучении и могут послужить источником новых терапевтических мишеней для лечения опухолевых заболеваний.

1. Оба ингибитора АКТ (ARQ092 и ARQ751) эффективно ингибируют звенья патогенетически активированного сигнального каскада PI3K/АКТ/MAPK в клетках ГИСО *in vitro* в терапевтических концентрациях (до 3 мкМ). Цитотоксическая активность обоих новых ингибиторов АКТ (ARQ092 и ARQ751) в виде монотерапии практически не превышает эффективности ИМ *in vitro* в трех различных линиях клеток ГИСО с разной чувствительностью к ИМ. АКТ ингибиторы увеличивают способность ИМ подавлять активность сигнальных киназ. Между этими веществами наблюдается цитотоксический синергизм.

2. Разработана новая ксенографтная модель ГИСО с первичной резистентностью к лечению ИМ; модель успешно перенесла многократные пассажи новым мышам; модельная опухоль имеет мутацию экзона 9 рецептора KIT, подобные мутации встречаются у 15% пациентов с ГИСО.

3. Эффективность заявленных комбинаций ингибиторов АКТ (ARQ092 и ARQ751) и ИМ протестирована на моделях с разными типами чувствительности к ИМ (первичная чувствительность, приобретенная резистентность и новая модель с первичной резистентностью). Ингибиторы не оказывают видимого побочного действия на модельных животных. Максимальная переносимая доза и эффективная доза ARQ751 (ингибитор второго поколения) была ниже, чем у ARQ092. Комбинация АКТ ингибиторов с ИМ в моделях вторичной и первичной устойчивости к ИМ не дала статистически значимого улучшения по сравнению с монотерапией ИМ, однако имела место тенденция к стабилизации размера опухоли.

4. Экспрессия гена *Bcl-1* при обработке клеток ингибиторами АКТ и ИМ воспроизводимо увеличивалась, однако, это проявлялось только на уровне мРНК во всех модельных линиях клеток. Эндогенного белка *Bcl-1* в клетках не обнаружено. Подавление экспрессии гена *Bcl-1* уменьшало выживаемость клеток, но не затрагивало реакцию на обработку ингибиторами. Выявленное взаимодействие сверхэкспрессированного белка *Bcl-1* с анти-апоптотическим белком *Bcl-XL*, может быть интересно в контексте лечения глиом ИМ, поскольку основное место экспрессии *Bcl-1* — ткани мозга.

5. Скрининг на изменения, вызванные обработкой ИМ и ингибиторами АКТ, в тотальном протеоме ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеток, позволил выявить увеличение уровня белка *PDCD4*, который активирует ингибитор клеточного цикла *p27* и апоптоз. Активация *PDCD4* была ассоциирована с лучшим эффектом комбинации ИМ/АКТ ингибитор. Эти же данные

выявили инактивацию транскрипционного фактора Elk1 и падения уровня экспрессии его мишеней. Изменения активности Elk1 могут представлять интерес для исследования терапии ГИСО, но явно не являются определяющими для эффекта исследованных ингибиторов.

6. Данные киномного профилирования показывают активацию АКТ не только в КИТ-мутантных, но и в других типах ГИСО: “дикого типа” и PDGFRa – мутантных. Эти данные могут служить обоснованием для клинических испытаний АКТ ингибиторов в терапии всех видов ГИСО. Комбинация АКТ ингибитора с ИМ не позволяет преодолеть резистентность к ИМ, обусловленную стерической мутацией КИТ рецептора, однако полученные данные указывают на целесообразность комбинирования АКТ-ингибиторов с новыми ингибиторами рецепторных киназ, рипретинибом и авапритинибом (в PDGFRa-мутантном подтипе ГИСО).

Научно-практические рекомендации

На основании полученных данных было разрешено проведение клинических испытаний АКТ ингибитора ARQ092 в комбинации с иммунотерапией PD1 ингибитором у больных с ГИСО. Оба АКТ ингибитора продемонстрировали синергизм *in vitro* в отношении выживаемости клеток ГИСО. При использовании комбинации АКТ ингибиторов с ИМ наблюдалась тенденция к лучшей стабилизации размера опухолей во всех использованных моделях, однако статистическая значимость при сравнении комбинации и стандартной терапии ИМ была достигнута только в ИМ-чувствительной модели. Следует указать на активность комбинации и положительную динамику у животных с первично ИМ-резистентными КИТ-мутантными опухолями, которые представляют особую сложность в клинической практике. Полученная положительная динамика дает обоснования для доклинического (и клинического) исследования АКТ-ингибиторов в сочетании с новыми ингибиторами рецепторных тирозинкиназ, такими как рипретиниб и авапритиниб. Рипретиниб не был одобрен на момент проведения нашего исследования, однако, сейчас показана его высокая ингибирующая эффективность в отношении мутантных форм КИТ, нечувствительных к ИМ. Второй новый тирозинкиназный ингибитор авапритиниб так же должен быть исследован в комбинации с АКТ ингибиторами. в PDGFRa-мутантных ГИСО, поскольку наши данные показывают заметную сверхактивацию АКТ в этом виде ГИСО. Кроме того, киномное профилирование и масс-спектрометрия указывают на возможность и обоснованность использования АКТ ингибиторов не только в PDGFRa мутантных формах ГИСО, но и в ГИСО “дикого типа” в виде монотерапии. Кроме того, полученные данные показали, что Vex1 достаточно мало экспрессируется в ГИСО, однако играет роль в поддержании клеточной жизнеспособности. При изучении роли Vex1 в ответе на комбинацию АКТ ингибитора выявлено его взаимодействие и, возможно, секвестрацию анти-апоптотического фактора Bcl-XL. Эти данные могут оказаться критически важными для разработки

лечения лейкозов и глиом, а также других онкологических заболеваний головного мозга, где Bcl-2 экспрессируется на высоком уровне. Поскольку использование иматиниба при лечении опухолей головного мозга активно изучаемая тема, данные о влиянии иматиниба на экспрессию проапоптотического фактора Bcl-2 становятся особенно важными, потому что открывают новые возможности для комбинирования ИМ с другими апоптоз-активирующими веществами для лечения этой группы онкологических заболеваний. Значительную роль в действии комбинации АКТ-ингибитора и ИМ по результатам представленной работы играет PDCD4, который вовлечен в регуляцию клеточного цикла и апоптоза. Недавние исследования выявили значительную эффективность ингибирования белка Wee1, регулирующего клеточный цикл, в терапии ГИСО [Ye и др., 2021], что служит обоснованием для комбинирования ингибиторов Wee1 и АКТ в различных типах ГИСО, с целью лучшего подавления клеточного цикла, независимо от устойчивости основного мутантного рецептора к таргетной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Козина, М.Т., Молекулярно-генетические основы персонализированной терапии гастроинтестинальной стромальной опухоли ингибиторами тирозинкиназных рецепторов / М.Т. Козина, Г.А. Абалаков, Д.В. Шарипова, Н.Л. Шимановский // Химико-Фармацевтический Журнал. – 2021. – т.55. - №4. - С.3-10.
2. Marya Kozinova, Identification of Wee1 as a target in combination with avapritinib for gastrointestinal stromal tumor treatment / Shuai Ye, Dinara Sharipova, Marya Kozinova, Lilli Klug, Jimson D'Souza, Martin G. Belinsky, Katherine J. Johnson, Michael C. Heinrich, Margret Einarson, Kathy Cai, Karthik Devarajan, Yan Zhou, Samuel Litwin, Ronald DeMatteo, Margaret von Mehren, James Duncan and Lori Rink // JCI insight. – 2021. - V.6. - №2. - e143474 (электронная публикация). – P.1-17.
3. Козина, М.Т., Новый подход к преодолению резистентности к таргетной терапии у мезенхимальных опухолей желудочно-кишечного тракта с помощью новых ингибиторов семейства протеинкиназ B (PKB) / М.Т. Козина, С.В. Каракашев, Т.А. Федотчева, Н.Л. Шимановский // Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». – 2020. - С.182
4. Marya Kozinova, Combinations of imatinib mesylate with AKT inhibitor (miransertib, ARQ 751) or FGFR inhibitor (derazantinib) show synergy in GIST cell lines and preclinical models / Marya Kozinova, Shalina Joshi, Karthik Devarajan, Phillip Zook, Jimson W. D'Souza, Jeffrey M. Farma, Nestor Esnaola, Reza Foroughi, Yi Yu, Brian Schwartz, Terence Hall, Margaret von Mehren and Lori A Rink // Cancer

Research (Proceedings of American Association of Cancer Research Annual Meeting). - 2018. – V.78. - №13 Supplement. – P.4808

5. M. Kozinova, Dual Inhibition of AKT and KIT is Synergistic in Gastrointestinal Stromal Tumor / M. Kozinova, S. Joshi, P. Zook, J. D'Souza, M. von Mehren, L. Rink, J.M. Farma, N.F. Esnaola, S.S. Reddy, R. Foroughi, Y. Yu, G. Abbadessa, T. Hall // Proceedings of American Connective Tissue Oncology Society (CTOS) Annual Meeting. – 2017. – P.63