

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЕНТГЕНОРАДИОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Кулинич Татьяна Михайловна

**РАЗРАБОТКА, ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ТАРГЕТНОГО ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
д.м.н., профессор
Боженко Владимир Константинович

Москва – 2026 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	11
ГЛАВА 1. КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ. ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ, ТАРГЕТНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	21
1.1 Сигнальные пути передачи митотического сигнала, ключевые молекулы, потенциальные мишени для разработки противоопухолевых препаратов.....	21
1.2. Сигнальный путь MAPK/ERK.....	24
1.2.1. RAS – одна из ключевых мишеней сигнального пути.....	32
1.2.2. Структура и функции белка Ras.....	35
1.2.3. Пути активации Ras.....	37
1.3. Белки клеточного цикла, их роль в физиологических процессах, изменения при онкологических заболеваниях, возможности использования в качестве мишеней при создании противоопухолевых препаратов.....	41
1.3.1. Белки клеточного цикла и их роль в физиологических процессах и при онкологии/развитии опухоли. Сигнальный путь пролиферации CDK4/CDK6-RB.....	43
1.3.2. Белки-ингибиторы циклинзависимых киназ и их роль в канцерогенезе.....	46
1.3.3. Роль пути CDK4/CDK6-RB в развитии злокачественных новообразований.....	47
1.4. Лекарственные препараты, направлено/таргетно воздействующие на ключевые мишени клеточного цикла (современное состояние проблемы).....	53
1.4.1. Ингибиторы белков семейства RAS.....	55
1.4.2. Ингибиторы CDK4/6.....	57
1.5. Метод внутриклеточной доставки, основанный на использовании технологии интернализуемых пептидов (cell penetrating peptides (CPPs)).....	64
1.5.1. Свойства пептидов, необходимые для интернализации.....	67
1.5.2. Возможные модели интернализации (проникновения) CPPs.....	67
1.5.3. Использование CPPs как векторов внутриклеточной доставки.....	72
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	76
2.1. Дизайн исследования.....	76
2.2. Исследуемые пептидные последовательности.....	83
2.2.1. Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Rас).....	83

2.2.2. Пептидные последовательности, полученные на этапе выбора перспективного кандидата.....	86
2.2.3. Лекарственные препараты, используемые в качестве препаратов сравнения.....	87
2.3. Исследования в условиях <i>in vitro</i>	89
2.3.1. Работа с клеточными линиями.....	89
2.3.2. Методы, используемые в экспериментальных исследованиях <i>in vitro</i>	91
2.4. Исследования в условиях <i>in vivo</i>	95
2.4.1. Содержание животных.....	95
2.4.2. Статистический анализ.....	96
2.5. Клинические исследования I/IIa фазы.....	97
2.5.1. Дизайн клинического исследования.....	97
2.5.2. Описание визитов и процедур клинического исследования.....	98
2.5.3. Популяция пациентов.....	103
2.5.3.1. Критерии включения.....	105
2.5.4. Критерии оценки результатов клинического исследования.....	107
2.5.5. Статистические методы анализа результатов.....	109
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПЕПТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (результаты собственных исследований).....	111
3.1. Выбор мишеней.....	111
3.2. Оценка первичной эффективности разработанных пептидных последовательностей.....	120
ГЛАВА 4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ – ПРЕПАРАТА ИНГ-РАС (результаты собственных исследований).....	128
4.1. Исследование <i>in vitro</i> проникающей способности пептидных последовательностей методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии.....	128
4.1.1. Исследование проникающей способности методом проточной цитофлуориметрии.....	129
4.1.2. Исследование проникающей способности методом флуоресцентной микроскопии.....	135
4.2. Исследование специфической фармакологической активности <i>in vitro</i> лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы.....	138

4.2.1. Проведение исследований <i>in vitro</i> по оценке противоопухолевой эффективности (антипролиферативный и цитотоксические эффекты) последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы.....	138
4.2.2. Изучение молекулярных механизмов противоопухолевого действия ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) <i>in vitro</i> на моделях перевивных культур опухолей человека.....	146
4.2.3. Результаты исследования воздействия пептидного ингибитора RAS-ГТФазы на клетки первичных культур рака желудка человека.....	156
4.2.4. Исследование на клеточных линиях HT29 и HCT116 сочетанного воздействия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы и химиопрепаратов.....	159
4.3. Исследование специфической фармакологической активности <i>in vivo</i> лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы K26K (Инг-Рас).....	169
4.3.1. Оценка противоопухолевой эффективности K26K на модели подкожно трансплантированной опухоли аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29).....	169
4.3.2. Оценка противоопухолевой эффективности K26K на модели подкожно трансплантированной опухоли аденокарциномы рака лёгкого человека (A549).....	172
4.4. Токсикологические исследования.....	175
4.4.1. Токсикологические исследования при однократном введении (острая токсичность).....	176
4.4.2. Токсикологические исследования подострой (субхронической) токсичности при внутривенном и внутривенном введении.....	180
4.5. Изучение мутагенного потенциала.....	191
4.5.1. Исследование потенциальной цитогенетической активности лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы в микроядерном тесте.....	192
4.5.2. Исследование мутагенности лекарственного средства пептидного ингибитора Ras-ГТФазы по его способности производить генные мутации в клетках млекопитающих в условиях <i>in vitro</i>	193
4.6. Изучение алергизирующих свойств.....	194
4.6.1. Оценка алергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы регистрацией реакции общей анафилаксии на морских свинках.....	194
4.6.2. Оценка алергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы постановкой реакции иммунных комплексов на морских свинках.....	195

4.6.3. Оценка алергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы методом конъюнктивальной пробы на морских свинках и крысах.....	196
4.7. Изучение иммунотоксических свойств.....	198
4.8. Изучение местно-раздражающих свойств.....	200
4.9. Изучение пирогенности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K).....	201
4.10. Доклинические исследования фармакокинетики лекарственного средства на основе пептидного ингибитора RAS-ГТФазы (K26K)	201
ГЛАВА 5. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ – ПРЕПАРАТА ИНГ-РАС (результаты собственных исследований)	207
5.1. Оценка фармакокинетики.....	207
5.2. Оценка безопасности.....	208
5.2.1 Результаты исследования безопасности в ходе I этапа исследования.....	209
5.2.2 Результаты исследования безопасности в ходе II этапа исследования.....	214
5.2.3. Дозолимитирующая токсичность.....	219
5.3. Результаты оценки эффективности препарата «Инг-Рас» в сравнении с контрольной (ретроспективной) группой.....	220
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	232
ВЫВОДЫ.....	245
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	247
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	248

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

AUC –	Area under the curve (площадь под кривой концентрация-время)
AUC (0→1) –	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время», к 1 часу
AUC (0→8) –	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время», к 8 часам
AUC _{0-t} –	Area under the pharmacokinetic curve/Площадь под фармакокинетической кривой концентрация/время
AUMC(0→t) –	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время»
Cdk –	Cyclin dependent kinase (циклин зависимая киназа)
Cl –	Клиренс;
C _{max} –	Максимальная концентрация
CPP –	Cell penetrating peptides, интернализуемые пептиды
CTCAE –	Common Terminology Criteria For Adverse Events (классификация НЯ по степени тяжести)
ECOG –	Шкала оценки тяжести состояния пациента, разработанная Eastern Cooperative Oncology Group (Восточная кооперативная онкологическая группа)
FAS –	Full analysis set /Полная анализируемая совокупность
FDA –	Food and Drug Administration / Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
GCP –	Good Clinical Practice (Надлежащая клиническая практика)
GLP –	Good Laboratory Practice (Надлежащая лабораторная практика)
GMP –	Good manufacturing practice / Надлежащая производственная практика
HED –	Human equivalent dose/Эквивалентная доза человека
ICH –	International Conference on Harmonization (Международная конференция по гармонизации)

ICH –	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use / Международный совет по гармонизации
IQR –	Interquartile range / Межквартильный размах
Kel –	Elimination constant / Константа элиминации
MAPK –	Mitogen-activated protein kinase / Митогенактивированные протеин киназы
Max –	Maximum / Максимум
MedDRA –	Medical dictionary for regulatory activities / Медицинский словарь для регуляторной деятельности
MEK киназа –	MAPK- extracellular regulated kinase / Внеклеточно регулируемые MAPK киназы
Min –	Minimum / Минимум
MRSD –	Maximum recommended starting dose / Максимальная рекомендованная стартовая доза
MRT –	Medium retention time/Среднее время удержания
NOAEL –	no observed adverse effect level (максимальная доза, не вызывающая обнаруживаемого вредного воздействия)
НУНА –	New York Heart Association / Нью-Йоркская кардиологическая ассоциации
p –	Уровень значимости
pH –	Pondus Hydrogenii / Водородный показатель или показатель кислотности
PIPAC –	Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy / Внутривентриальная аэрозольная химиотерапия
PKC –	Protein Kinase C/протеин киназа C
PT –	Preferred Term / Предпочтительный термин (MedDRA)
Q1-Q3 –	Quartile / Первый и третий квартили
RAF-киназа –	Цитозольная серин/треониновая протеинкиназа семейства

МАРЗК

RAS-ГТФаза –	Семейство клеточных сигнальных белков, «малых» (около 21 кДа) G-белков, относящихся к суперсемейству RAS
RECIST –	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors / Критерии оценки ответа солидных опухолей
SOC –	System Organ Classes / Системно-органный класс (MedDRA)
$t_{1/2}$ –	Half-life / Период полувыведения
T_{max} –	Time to maximum concentration / Время достижения максимальной концентрации
V_0 –	центральный объем распределения;
V_d –	Volume of distribution / Объем распределения
V_{ss} –	Volume of Steady-state of distribution / Стационарный объем распределения
АД –	Артериальное давление
АТХ –	Анатомо-терапевтическо-химическая классификация
БСА –	Бычий сывороточный альбумин
в/в –	внутривенное введение
ГЗТ –	Реакции гиперчувствительности замедленного типа
ГОСТ –	Государственный стандарт РФ
ДИ –	Доверительный интервал
ЕМА –	European Medicines Agency / Европейское агентство лекарственных средств
ЕС –	Европейский Союз
ИнП (ИП) –	Интернализуемые пептиды
ИС –	Информированное согласие
ИФА –	Иммуноферментный анализ
K26K –	Инг-Рас, пептидный ингибитор РАС-ГТФазы, ингибитор Ras-ГТФазы, Ras-Antp
КЗ –	Клинически значимые

КИ –	Клиническое исследование
КНЗ –	Клинически не значимые
КТ –	Компьютерная томография
ЛДГ –	Лактатдегидрогеназа
Мед –	Медиана
Минздрав России/МЗ РФ –	Министерство Здравоохранения Российской Федерации
МПД –	Максимально переносимая доза
МРТ –	Магнитно-резонансная томография
НКМД –	Независимый Комитет по Мониторингу Данных
НЛР –	Нежелательная лекарственная реакция
НПКО –	Нижний предел количественного определения
НЭК –	Независимый этический комитет
НЯ –	Нежелательное явление
ПХЭ –	полихроматофильные эритроциты
РНК –	Рибонуклеиновые кислоты
РНЦРР –	Российский научный центр рентгенорадиологии
РФ –	Российская Федерация
Стах–	Maximum plasma concentration / Максимальная концентрация
СанПиН –	Санитарно-эпидемиологические правила и нормы
СНЯ –	Серьезное нежелательное явление
СО –	Стандартное отклонение
СОП –	Стандартная операционная процедура
СОЭ –	Скорость оседания эритроцитов
Ср. –	Среднее
СРР –	Cell penetrating peptides / Пептиды, проникающие в клетку
ФГБУ–	Федеральное государственное бюджетное учреждение
ФЗ –	Федеральный Закон
ФИС –	Форма информированного согласия

ФК (РК) –	Фармакокинетика (набор данных для фармакокинетического (pharmacokinetics, РК) анализа)
ЦНС –	Центральная нервная система
ЧДД –	Частота дыхательных движений
ЧСС –	Частота сердечных сокращений
ЭКГ –	Электрокардиография
ЭхоКГ –	Эхокардиография

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Успехи молекулярной биологии и биотехнологии позволили установить механизмы, ответственные за процесс пролиферации и гибель клеток, которые открыли перспективы к созданию препаратов, направленно действующих на белки, участвующие в процессах канцерогенеза и определяющие такие характерные особенности опухоли, как прогрессия (неконтролируемый рост) и метастазирование [15]. Изучение генома различных опухолей выявило множество генетических и эпигенетических механизмов нарушения, приводящих к активации или, наоборот, к инактивации внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих важнейшие жизнеобеспечивающие функции опухолевой клетки, в том числе и определяющие ее злокачественность [10, 27]. Это в свою очередь, позволило выявить перспективные мишени для создания новых противоопухолевых таргетных препаратов (от англ. *target* — мишень, цель) и разработать диагностические тесты, предсказывающие их высокую эффективность [11, 22, 67].

Мишенями таргетных препаратов являются факторы роста и их рецепторы, в первую очередь рецепторы эпидермального фактора роста (EGF) и факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) [4, 161], белки, осуществляющие проведение митогенных сигналов от рецепторных молекул [77, 410], нерцепторные тирозинкиназы (ТК), белки семейства Ras, циклин-зависимые киназы [16, 261, 417], молекулы, контролирующие апоптоз (Bcl2, p53 и др.) и ангиогенез [26, 35]. Внедрение в клиническую практику таргетных препаратов значительно улучшило результаты лечения больных злокачественными опухолями, многие из которых считались резистентными к существующей химиотерапии и характеризовались крайне неблагоприятным прогнозом [33, 226]. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано и применяются для лечения солидных опухолей около 40 препаратов, большая часть которых направлена на лечение больных раком легкого, молочной железы, меланомы, колоректальным раком, раком почки [33, 156]. Активно ведется поиск потенциальных мишеней и разработка новых

препаратов направленного действия, также большое внимание уделяется исследованиям препаратов, направленных на мишени, не специфичные для отдельных локализаций опухолей, и потенциально способных приобрести так называемые «tumor-agnostic» показания [147, 335, 355].

Несмотря на огромное количество мутационных и функциональных изменений в опухолевой ДНК, лишь для небольшой части из них удалось подтвердить клиническое значение в канцерогенезе различных опухолей и для еще меньшего количества созданы эффективные противоопухолевые препараты, способные контролировать опухолевый рост и обусловленные конкретной дисфункцией гена [53, 217, 419]. Для наиболее частых мутаций, таких как p53 или K-RAS, до сих пор не найдены возможности восстановить (p53) или наоборот подавить (K-RAS) активность мутированного белка [97, 169].

Достижения последних лет в онкологии во многом связаны с направлением, получившим название «таргетная терапия» [32, 274]. Появление таргетной терапии внесло существенный вклад в лечение онкологических пациентов, в том числе ранее неизлечимых опухолей. Тем самым это позволило повысить эффективность и контролируемость лечения, что привело к изменению прогноза у многих пациентов самым радикальным образом. Однако, остается ряд нерешенных проблем. Во-первых, это развитие резистентности, что заставляет онкологов как бы догонять опухоль, изобретая все новые поколения препаратов, по аналогии с бактериями, научившимися приобретать резистентность к антибиотикам. Вторым недостатком этого вида лечения является необходимость постоянного воздействия на мишень, так как большинство таргетных препаратов лишь переводит опухоль в неактивное состояние, при этом не излечивая полностью. В-третьих, таргетная терапия зачастую требует выполнения сложных диагностических тестов, будь то иммуногистохимия или молекулярно-генетический тест, все это требует ожидания и порой задерживает начало лечения. Таргетные препараты являются довольно дорогими и оказывают большую нагрузку на систему здравоохранения. Также важной проблемой является внутриклеточная доставка биологически активных соединений. С

помощью таргетной терапии удастся эффективно воздействовать как на поверхностные мишени с применением, например, моноклональных антител, так и или на внутриклеточные с использованием так называемых «малых молекул», молекул с молекулярной массой достаточно низкой для пассивного проникновения через клеточную мембрану. В тоже время, большинство изменений при канцерогенезе затрагивает работу именно крупных белков, входящих в белковые комплексы, не имеющих так называемые «активные центры» - мишени для низкомолекулярных ингибиторов. Доставка же крупных молекул в клетку представляет сложную биотехнологическую проблему.

В настоящее время большое количество исследований посвящено поиску и разработкам эффективных способов адресной доставки функциональных молекул, особенно при воздействии на внутриклеточные мишени. Предложено несколько вариантов решения проблемы эффективной внутриклеточной доставки, в частности, использование наночастиц, экзо- или липосом, рецепторно-опосредованный транспорт. Еще одним путем решения проблемы адресной доставки могут являться интернализуемые пептиды (ИнП), которые представляют собой короткие последовательности аминокислот ($n=15-30$), способные выполнять векторные функции в отношении пептидных последовательностей и соединений другой химической природы (РНК, ДНК).

Благодаря более глубокому пониманию онкогенов, белковых комплексов, значимых для канцерогенеза, а также выявлению путей передачи сигналов, связанных с опухолями, ожидается появление новых молекулярных мишеней для создания таргетных противоопухолевых препаратов. Разработка лекарственных средств, сочетающих высокую биодоступность и таргетное воздействие на молекулярные мишени, является крайне актуальной, активно развивающейся областью онкологии и фармакологии, в которой решение задачи по открытию эффективных транспортных векторов будет способствовать существенному прогрессу в создании новых препаратов с заданными таргетными свойствами.

Таким образом, дальнейшая разработка новых препаратов, обеспечивающих эффективное взаимодействие с внутриклеточными мишенями, остается

приоритетной задачей науки и медицины. Использование инновационных подходов, таких как применение интернализуемых пептидов и таргетного воздействия на молекулярные мишени, обещает значительный прорыв в лечении онкологических заболеваний и создании лекарств нового поколения. С учетом изложенного выше, нами была спланирована и успешно проведена исследовательская работа, результаты которой легли в основу настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования

Разработка технологии получения новых пептидных противоопухолевых препаратов и проведение комплекса доклинических и клинических исследований пептидного ингибитора Ras-ГТФазы («Инг-Рас»).

Задачи исследования

1. Провести поиск и разработку пептидов, обладающих способностью ингибировать ключевые белки канцерогенеза, ответственные за процессы контроля пролиферации, дифференцировки и выживания.
2. Исследовать в условиях *in vitro* биологические и противоопухолевые свойства пептидов, ингибирующих ключевые белковые комплексы контроля пролиферации, дифференцировки и выживания клеток. Выбрать наиболее эффективную пептидную конструкцию для последующего изучения в качестве потенциального кандидата нового лекарственного препарата.
3. Оценить эффективность и специфическую противоопухолевую активность выбранного пептида – ингибитора Ras-ГТФазы - потенциального противоопухолевого препарата с использованием методов *in vitro* и *in vivo*. Выявить наиболее эффективные способы и схемы введения препарата.
4. Провести полный комплекс доклинических исследований нового потенциального лекарственного препарата и оценить результаты проведенных исследований.

5. Разработать с учетом результатов доклинических исследований дизайн клинического исследования I/IIa фазы потенциального лекарственного средства «Инг-Рас», полученного на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы.

6. Провести клинические исследования I/IIa фазы потенциального препарата «Инг-Рас», оценить его безопасность и первичную эффективность у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта, имеющих высокий риск развития перитонеального канцероматоза.

Научная новизна исследования

Впервые с помощью современных методов математического моделирования и анализа межмолекулярных взаимодействий создана оригинальная концепция разработки пептидных препаратов, способных выступать в роли селективных ингибиторов основных белковых комплексов и транскрипционных факторов, участвующих в критических процессах жизнедеятельности раковой клетки. К таким процессам относятся клеточная пролиферация, дифференцировка и поддержание жизнеспособности опухоли. Подобный подход позволил создать принципиально новую стратегию борьбы с онкологическими заболеваниями, направленную на нарушение работы конкретных звеньев внутриклеточной сигнализации, необходимых для размножения и распространения опухолевых клеток. На основании проведенных расчетов, синтезирована библиотека пептидных последовательностей, доказаны противоопухолевые свойства полученных молекул. Эти пептиды были подвергнуты тщательной проверке *in vitro* и *in vivo*, в результате которой было доказано наличие выраженных противоопухолевых свойств у отобранных кандидатов. Данный этап стал ключевым в подтверждении правильности выбранной концепции и позволил перейти к следующему важному направлению исследований.

Впервые в Российской Федерации в терапевтической конструкции использована технология интернализуемых (CPP, cell penetrating peptides) пептидов для осуществления эффективной внутриклеточной доставки функциональной последовательности. Эта методика позволила решить одну из главных проблем современной таргетной терапии — доставку

высокоспецифичных препаратов внутрь клеток. Реализация данной технологии в рамках терапевтической конструкции открывает широкие перспективы для дальнейшего совершенствования методики адресной доставки биологически активных веществ.

Получен эффективный пептидный/высокомолекулярный ингибитор Ras-ГТФазы, доказана его эффективность и безопасность в комплексе проведенных доклинических исследований, что делает его многообещающим кандидатом для внедрения в клиническую практику.

Проведены первые клинические испытания российского оригинального препарата - ингибитора Ras-GTPase («Инг-Рас»), что позволило объективно оценить влияние препарата на динамику течения болезни у реальных пациентов. Анализ результатов исследования показал статистически достоверное увеличение продолжительности общей и безрецидивной выживаемости среди пациентов, принимавших участие в исследовании, по сравнению с пациентами исторических контрольных групп. Полученные результаты указывают на высокий терапевтический потенциал препарата и создают предпосылки для его дальнейшего широкого клинического применения.

Таким образом, проведенное исследование представляет собой сочетание новейших технологий математического моделирования, молекулярной биологии, биохимии и клинической медицины, позволяющее выйти на качественно новый уровень разработки эффективных противоопухолевых препаратов и методов лечения онкологических заболеваний.

Практическая значимость

Разработан новый технологический подход создания противоопухолевых препаратов, основанный на методах математического моделирования белковых взаимодействий и принципах селективного воздействия на конкретные молекулярные мишени. Метод показал высокую перспективность получения потенциальных лекарственных препаратов, имеющих широкий спектр противоопухолевой активности.

Доказана возможность использования технологии CPP (cell penetrating peptides) в качестве векторов, обеспечивающих эффективную внутриклеточную доставку пептидных молекул.

Разработан новый лекарственный препарат - ингибитор Ras-ГТФазы («Инг-Рас»). Проведенные клинические исследования I/IIa фазы продемонстрировали удовлетворительный профиль безопасности при выбранном способе введения (PIRAC) и достоверное увеличение показателя безрецидивной выживаемости при распространенных формах опухолей желудка и толстого кишечника. Введение в клиническую практику нового противоопухолевого препарата, ингибирующего сигнальный путь MAPK/ERK путем воздействия на Ras-ГТФазу, позволит увеличить продолжительность жизни пациентов с высоким риском перитонеального канцероматоза при опухолях желудочно-кишечного тракта, повысить вероятность долгосрочной стабилизации, снизить количество рецидивов.

Положения, выносимые на защиту

Методы математического анализа трехмерных структур белковых комплексов и компьютерное моделирование их взаимодействия с химерными пептидными конструкциями обеспечивают возможность конструирования новых пептидных последовательностей с заранее прогнозируемыми биологическими характеристиками, что позволяет целенаправленно проектировать эффективные противоопухолевые препараты.

Интернализуемые (CPPs) транспортные пептиды обладают высоким потенциалом для внутриклеточной доставки терапевтических пептидных последовательностей, открывая уникальные возможности для разработки лекарственных средств, нацеленных на молекулярные мишени.

Новый лекарственный препарат «Инг-Рас», созданный на основе ингибирования активности Ras-ГТФазы, подтвердил в клинических исследованиях I/IIa фаз хорошую переносимость и высокую эффективность, показывая достоверное увеличение безрецидивной и общей выживаемости у пациентов с распространенным заболеванием желудочно-кишечного тракта, что

открывает перспективы для его дальнейшего исследования и последующего внедрения в клиническую практику онкологического профиля.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационного исследования были представлены и получили одобрение на ряде ведущих российских и международных научных конференций и мероприятиях:

XV Всероссийская научно-практическая конференция имени А. Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» 14–19 октября 2018 г., г.Москва; Второй международный Форум онкологии и радиологии 11–13 марта 2019 г., г.Санкт-Петербург; XXIV Российский онкологический конгресс 16–19 ноября 2020 г., г. Москва; VIII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи» 16–18 июня 2022 г., г.Санкт-Петербург; VII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии 24–26 мая 2023 г., г.Екатеринбург; Ярмарка продуктовых разработок в сфере медицины и здравоохранения (Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России) 12–14 сентября 2023 г., г.Москва; 2024 г., Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика» (ISSN: 2618-9305) 14–17 октября 2024 г., г.Пушино, Московская область.

Также результаты работы были доложены на совместном заседании научно-практической конференции и Совета по защите докторских диссертаций Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 4 от 26 июня 2025 года).

Внедрение результатов работы

На основании результатов доклинических исследований и фармацевтической разработки противоопухолевого препарата «Инг-Рас» были проведены клинические исследования I/IIa фазы на базе Федерального

государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России). Исследования проводились в соответствии с утвержденным протоколом № 2022-1-Инг-Рас, а также на основании разрешения на проведение клинического исследования № 177 от 30 марта 2023 года, выданного Министерством здравоохранения Российской Федерации.

Итоги проведенных исследований I/Па фазы позволили подготовить и утвердить протокол клинического исследования IIb фазы, получено разрешение Министерства здравоохранения Российской Федерации № 221 от 21 мая 2025 года на проведение клинического исследования.

Результаты, полученные в процессе разработки функциональных пептидных конструкций, внедрены в образовательный процесс кафедры клеточной биомедицины и клеточных технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России).

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 25 научных работ, среди которых: 23 статьи в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертации, из которых 11 индексированы в международной системе SCOPUS.

Получено 4 патента, поданы 2 заявки, одна из которых на международный патент.

Грант № 20-015-00068 Российского фонда фундаментальных исследований, 2020 г. «Анализ интегральных свойств, моделирование и создание таргетных интернализуемых пептидов», руководитель Кулинич Т.М.

Объем и структура диссертации

Текст диссертации изложен на 294 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 419 источников (из них 37 отечественных, 382 зарубежных), иллюстрирована 21 таблицей, 82 рисунками, 1 приложением (патенты). Работа иллюстрирована 82 рисунками и графиками и 21 таблицей.

ГЛАВА 1. КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ. ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ, ТАРГЕТНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Сигнальные пути передачи митотического сигнала, ключевые молекулы, потенциальные мишени для разработки противоопухолевых препаратов

Существование сложных многоклеточных организмов возможно благодаря координации биохимических процессов, протекающих в их клетках. Основой такой координации служат межклеточная коммуникация и передача сигнала внутри отдельных клеток [10, 274]. В организме млекопитающих существуют разнообразные системы коммуникаций, обеспечивающие взаимное координирование деятельности клеток и тканей при адаптации к тем или иным изменениям среды [24]. Широко известны и общепризнаны: 1) коммуникация посредством секретируемых молекул (такие как гормоны, ростовые факторы, нейротрансмиттеры) и рецепторов к ним [2, 240]; 2) коммуникация посредством межклеточных контактов (адгезионные молекулы и рецепторы к ним) [37]. Оба эти механизма предусматривают взаимодействие между сигнальной молекулой и связывающей ее молекулой-рецептором, которое должно опосредовать запуск определенной цепочки последовательных реакций (signal-transduction chain) в соответствии с генетически обусловленной программой. Такой тип коммуникации можно уподобить отдаче/приему команды, предполагающей реакцию в виде стереотипного набора действий (пусть даже очень сложного) [11, 27].

Регуляция развития и организации тканей, а также контроль процессов пролиферации, деления и клеточной гибели осуществляются преимущественно внеклеточными сигнальными молекулами, которые могут действовать как на ближайшие клетки, так и на клетки, расположенные на значительном расстоянии [6, 25, 35]. В большинстве случаев передача сигнала внутри клетки представляет собой цепь последовательных биохимических реакций, осуществляемых ферментами, часть из которых активируется вторичными посредниками [26, 226].

Такие процессы обычно являются быстрыми: их продолжительность — порядка миллисекунд в случае ионных каналов и минут — в случае активации протеинкиназ и липид-опосредованных киназ. Однако, в некоторых случаях от получения клеткой сигнала до ответа на него могут проходить часы и даже сутки (в случае экспрессии генов) [37]. Пути передачи сигнала, часто бывают организованы как сигнальные каскады (англ. signal cascade): количество молекул белков и других веществ, принимающих участие в передаче сигнала, возрастает на каждом последующем этапе по мере удаления от первоначального стимула (амплификация сигнала), таким образом, даже относительно слабый стимул может вызывать значительный ответ [3, 14, 19, 198].

Рецепцию (получение) сигнала осуществляют белки, которые могут находиться как на поверхности (чаще трансмембранные белки), так и внутри клетки. Связывание сигнальной молекулы с рецептором, приводит к его активации и инициирует передачу внутриклеточного сигнала через один или несколько путей. Внутриклеточный сигнальный путь заканчивается белками-эффекторами, которые непосредственно и изменяют функционирование клетки. Белки-эффекторы чаще всего являются белками-регуляторами генов, частями цитоскелета, компонентами метаболического пути или ионными каналами [2, 4, 20].

Передача сигнала от рецептора к белку-эффектору происходит через целый ряд промежуточных белковых молекул. Для передачи сигнала обычно используется каскадное фосфорилирование промежуточных белков за счет их протеинкиназной активности. Протеинкиназы — это ферменты ковалентно присоединяющие один или несколько фосфатных групп к определенным аминокислотам в сигнальном белке [306]. В зависимости от аминокислот, которые модифицируют протеинкиназы, их делят на тиразиновые, серин/треониновые, двойной специфичности и гистидиновые протеинкиназы, встречающиеся у прокариот [130]. Большинство протеинкиназ человека — это серин/треониновые и, в меньшей степени, тиразиновые протеинкиназы [32, 92]. В реакции фосфорилирования используются фосфатные группы молекул АТФ,

превращая ее в АДФ [240, 261, 417]. В паре с протеинкиназами работают протеинфосфатазы, функцией которых является удаление фосфатных групп с сигнальных белков, тем самым реализуя обратную регуляцию. Фосфорилирование приводит к изменению в структуре белка, инициируя последующую передачу сигнала дальше по каскадному механизму, который заканчивается на белках-эффекторах [171].

Другой важный способ передачи сигналов внутри клетки происходит через GTP-связывающие белки, которые часто ассоциированы с поверхностными рецепторами. GTP-связывающие белки в активном состоянии связаны с GTP и инактивируются при его гидролизе до GDP [78, 410]. Существует два основных типа GTP связывающих белков: крупные тримерные GTP-связывающие белки (G-белки) и небольшие мономерные GTPазы (малые G-белки). Переключение G-белков из неактивного состояния в активное осуществляют факторы обмена гуаниновыми нуклеотидами (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEF), а инактивацию выполняют GTPаза-активирующие белки (GTPase-Activating Proteins, GAP) за счёт ускорения гидролиза связанного GTP [305, 306]. Передача сигнала от рецептора внутрь клетки возможна несколькими путями: 1. рецептор имеет внутриклеточный домен с протеинкиназной активностью (EGF, PDGF, VEGF, M-CSF, SCF); 2. протеинкиназы не являются частью рецептора, но связаны с его внутриклеточным доменом (большинство интерлейкинов, интерфероны); 3. с рецептором связаны адаптерные молекулы, которые после самосборки «платформы» рекрутируют протеинкиназы (IL1a, b, IL18, IL33) [130, 231, 232, 241].

Каждая клетка многоклеточного организма подвержена одновременно действию множества (сотен) различных сигнальных молекул. При этом клетки отвечают на сигнальные молекулы селективно, в зависимости от типа и функциональной активности клеток. Однако, практически любой клетке требуется минимальный набор сигналов, поддерживающих ее жизнедеятельность. Полное отсутствие экзогенных сигналов обычно инициирует гибель клетки путем апоптоза [68, 229, 321]. Ответ клетки на экзогенный сигнал зависит не только от

набора рецепторов, которые она несет на своей поверхности, но и от внутриклеточных белков, при помощи которых она передает сигнал [174]. Поэтому одна и та же сигнальная молекула может действовать на разнообразные типы клеток по-разному. Это реализуется либо за счет того, что одну и ту же сигнальную молекулу связывают два различных рецептора или за счет того, что один и тот же рецептор в разных типах клеток может быть связан с разными сигнал-передающими белками [241].

В настоящее время установлено несколько эволюционно консервативных сигнальных путей, играющих ключевую роль в развитии опухолевых клеток: Notch, Wingless type (Wnt), Sonic hedgehog (Shh), Jak-STAT, MAPK / ERK, PI3K, NF-κB и Smad пути [122, 143]. Показано, что эти множественные сигнальные пути участвуют в поддержании тканевого гомеостаза, пролиферации и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ESC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS-клетки), стромальных/стволовых клеток, полученных из жировой ткани (ASC) [110, 122, 220, 385]. Все это навело ученых на мысль, что эти сигнальные пути, возможно, влияют на прогрессию в опухолевых клетках. Далее представлены сигнальные пути и молекулярные мишени, имеющие наибольшее значение в процессах канцерогенеза и в разработках препаратов, таргетно воздействующих на данные мишени.

1.2 Сигнальный путь MAPK/ERK

Ras/Raf/MEK/ERK сигнальный путь регулирует экспрессию большого числа белков, вовлеченных в контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза [143, 211]. В ответ на связывание фактора роста, цитокина или гормона к рецептору на поверхности клетки уровень Ras-гуанидин трифосфата в клетке увеличивается, что стимулирует киназную активность. Форма Ras, которая находится во взаимодействии с GTP, связывает из цитозоля Raf-киназу и локализует ее на плазматической мембране. Локализованная на мембране киназа Raf, фосфорилируется другими киназами, а также подвергается аутофосфорилированию. Активированная и мембранно-ассоциированная Raf-

киназа образует комплекс с MAPK киназами, который включает два класса киназ: ERK-киназы, регулируемые экстрацеллюлярными сигналами, и MAPK/ERK (MEK). MAPK каскад инициируется активацией (фосфорилированием) MEK с помощью Raf-киназы с последующим фосфорилированием (и активацией) ERK MEK киназой. Активированный ERK диссоциирует из Ras/Raf/MEK/ERK комплекса и фосфорилирует ряд белков цитоскелета, а также ряд киназ и транскрипционных факторов, таких как NF-κB, AP-1, ETS-1 c-Jun, c-Myc [36, 50, 67, 109].

Каскад ERK (extracellular-signal-regulated kinase) активируется множеством внеклеточных агентов, включая факторы роста (EGF, FGF, PDGF), гормоны (фолликулостимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон), цитокины (IL-1, TNF-α, LPS) и нейротрансмиттеры (дофамин, серотонин, глутамат), вызывая, в основном, пролиферацию и дифференцировку. Он инициируется мембранными рецепторами, включающими RTK (реакция на ультрафиолет), рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), ионные каналы (кальциевый канал), интегрины и др. Эти рецепторы передают сигнал, рекрутируя адаптерные белки (Grb2, Shc, Crk и др.) и промежуточные белки (SOS, C3G и др.), которые, в свою очередь, вызывают активацию Ras или Rap1 на плазматических мембранах (Рисунок 1) [234, 245, 395].

Передача сигналов через большинство RTK и интегринов связана с адаптерными белками IRS1, SHC (Src homology 2 domain containing transforming protein), FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate 2), которые взаимодействуют с рецептором и фосфорилируются [101, 337]. Они заякориваются на мембране за счет взаимодействия с PIP3, с ними способен взаимодействовать Grb2, который связывается с фосфорилированными участками через домены SH2. После этого GRB2 посредством домена SH3 связывается с двумя богатыми пролином последовательностями Gab, инициируя его фосфорилирование и появление сайтов связывания для многих белков: PI3K, SHP2, PLC и др. [42, 240, 314]. Кроме того, с SH3 доменом GRB2 связывается богатый пролином конец белка, кодируемый геном SOS (Son of Sevenless,

относится к Ras-GEF), который тоже способен заякориваться на мембране за счет взаимодействия с PIP3 своим PH доменом. Белок SOS стимулирует диссоциацию GDP, последующий захват GTP из цитозоля и его присоединение к белку Ras, в результате чего происходит его активация. Когда SOS активирует Ras в результате простой положительной обратной связи, Ras еще сильнее стимулирует SOS [85, 203].

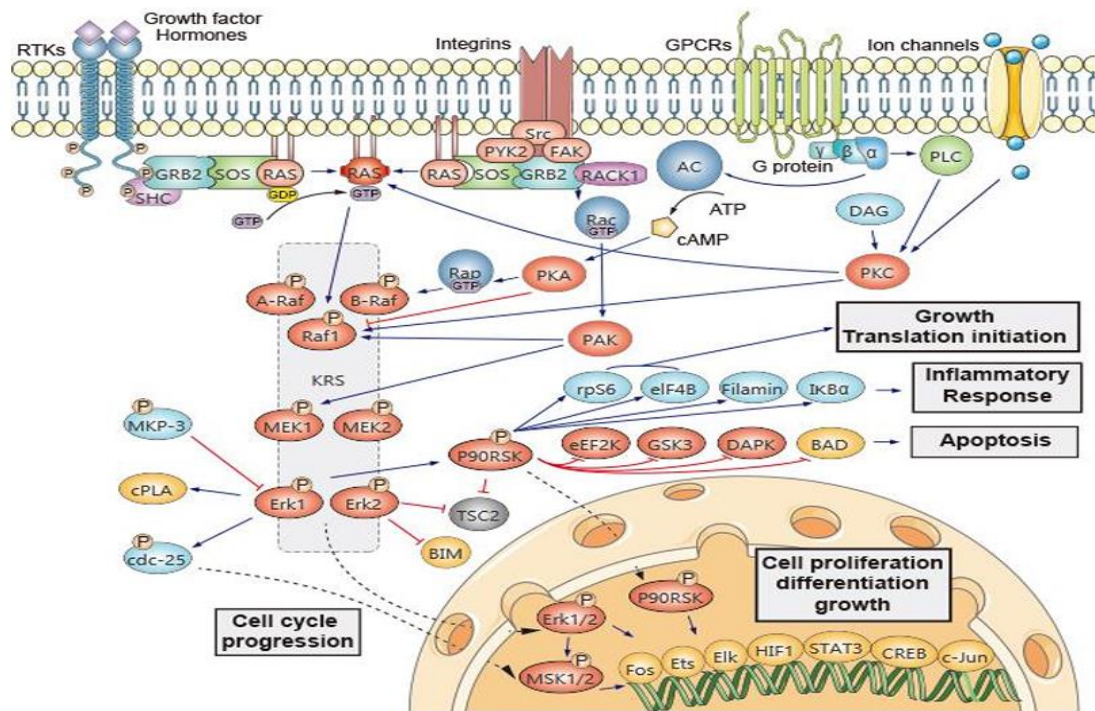


Рисунок 1 – Схема сигнального пути ERK.

Примечание - ERK-путь представляет собой каскад белков внутри клетки, передающих сигналы от мембранных рецепторов к ядру клетки. Активация начинается со связывания фактора роста с мембранным рецептором тирозинкиназой (RTKs). Это вызывает димеризацию и аутофосфорилирование рецептора, создавая сайт для присоединения адапторных белков (Grb2/SOS). Далее активируется Ras-белок путем обмена ГДФ на ГТФ. Активированный Ras стимулирует MAPKK-киназы (MEK), которые фосфорилируют и активируют ERK-киназу. Фосфорилированный ERK проникает в ядро, где регулирует транскрипционные факторы, влияющие на клеточный цикл, дифференцировку, выживаемость и пролиферацию клеток [158]

Еще один путь передачи сигнала через белки Ras связан с активацией Gαβ фосфолипазы C (PLC), которая гидролизует фосфатидинозитол (PIP2) на два вторичных медиатора инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлекаются в последующие этапы сигнальных путей. В частности, они модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и

протеинкиназу С, соответственно. IP3 является вторичным мессенджером и мигрирует к эндоплазматическому ретикулуму (ЭР), где взаимодействует с кальциевыми каналами, увеличивая цитоплазматический уровень кальция, который необходим для активации РКС [197, 200, 308]. Кальций является универсальным внутриклеточным медиатором. В норме в цитоплазме его концентрация мала ($\sim 10^{-7}$ Моль), в то время как в ЭР и внеклеточном пространстве значительно выше ($\sim 10^{-3}$ Моль), что создает градиент концентрации ионов Ca^{2+} . Градиент концентрации ионов позволяет за секунды, при открытии каналов, увеличить концентрацию в цитозоле кальция в десятки раз и активировать Ca^{2+} -зависимые белки клетки, такие как РКС [133, 197, 351].

Поддержание низкой концентрации кальция в цитоплазме способствуют Ca^{2+} -насос, использующий энергию гидролиза АТФ для откачки Ca^{2+} из цитозоля. Мышечные и нервные клетки, интенсивно использующие кальциевую сигнализацию, несут на мембране дополнительный транспортный белок Ca^{2+} (Na^+ -зависимый Ca^{2+} -обменник), сопрягающий выходящий ток Ca^{2+} с входящим током Na^+ [99, 347]. Еще один переносчик кальция находится в мембране ЭР (Ca^{2+} -насос) и позволяет ЭР захватывать из цитозоля большое количество Ca^{2+} против значительного градиента концентрации. Самым важным белком, инициирующим передачу сигнала через увеличение кальция внутри цитозоля, является кальмодулин, содержащийся во всех эукариотических клетках (до 1% всей массы белка клетки) [336, 347].

DAG может быть расщеплен с высвобождением арахидоновой кислоты, которая сама по себе может служить сигнальной молекулой или может быть использована для синтеза других малых липидных сигнальных молекул — эйкозаноидов [193, 392]. Второй функцией диацилглицерина является активация важной серинтреониновой протеинкиназы, которая, поскольку она зависима от Ca^{2+} , носит название протеинкиназы С (Protein Kinase C, РКС). Начальное, вызванное IP3, повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле влияет на РКС таким образом, что она переносится из цитозоля на цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны. Там она активируется сочетанием Ca^{2+} ,

диацилглицерина и отрицательно заряженного мембранного фосфолипида фосфатидилсерина [291, 374]. Еще одним источником Ca^{2+} являются мембранные кальциевые каналы, работа которых так же связана с активацией РКС [374, 392]. Активированная РКС фосфорилирует белки-мишени, характерные для данного типа клеток. Например, в мозге РКС активирует белок SOS [98]. Третьей функцией DAG является прямая активация Ras-GRP, путем его заякоривания на мембране, а также косвенно посредством РКС-опосредованного фосфорилирования Ras GRP [210, 350]. Ras-GRP (RAS guanyl nucleotide-releasing protein) способствует специфической активации Ras, путем замены GDP на GTP в составе белка. Он играет важнейшую роль в активации, развитии и дифференцировке Т- и В-лимфоцитов [99, 195]. Ras-GRP это семейство белков, выполняющих свои функции в разных клетках: RasGRP1 участвует в активации и передаче сигнала от TCR (T cell receptor), а RasGRP1 и RasGRP3 играют роль в клетках посредством передачи сигнала от BCR, RasGRP2 через Rap участвует в контроле адгезии тромбоцитов, тогда как RasGRP4 контролирует активацию Ras в тучных клетках [111, 195, 347, 411].

Инициация сигнального пути MAPK/ERK может происходить разными путями, но все они связаны с активацией белков семейства Ras [336, 340]. Суперсемейство Ras включает более 50 членов и состоит из множества семейств мономерных GTPаз, но только семейства Ras и Rho передают сигналы от поверхностных рецепторов. Ras-GTPазы имеют несколько общих черт: их молекулярная масса составляет 18–28 кДа, способность связывать и гидролизовать GTP [336, 353]. У человека семейство Ras представлено в основном H-Ras (Harvey-Ras), K-Ras (Kirsten-Ras), N-Ras (Neuroblastoma-Ras), Rap1 и Rheb, а семейство Rho - Rho, Rac и Cdc42. H- Ras, K- Ras и N- Ras размером 21 кДа участвуют в передаче сигналов от RTK, Rap1 активируется сАМР-зависимой GEF и влияет на адгезию клеток за счет активации интегринов, а Rheb активирует mTOR для стимуляции клеточного роста. Представители семейства Rho передают сигналы от поверхностных рецепторов на цитоскелет и другие органеллы. Несмотря на то, что белки семейств Ras и Rho выполняют

различные функции, действуют они по одному и тому же принципу [69, 253, 240]. Эти белки содержат одну или несколько ковалентно связанных липидных групп, заякоривающих белок на цитоплазматической мембране. Белки суперсемейства Ras имеют два различных конформационных состояния: активное — при связанном GTP и неактивное — при связанном GDP. Поэтому на активность этих белков действуют факторы обмена гуаниновых нуклеотидов Ras (Ras-GEF), которые стимулируют диссоциацию GDP и последующий захват GTP из цитозоля и GTPаза-активирующие белки Ras (Ras-GAP), увеличивающие скорость гидролиза связанного GTP, т. е. инактивируют белки Ras [69, 353].

Фосфорилирование тирозина и активация Ras, вызванные активированными РТК обычно непродолжительны: и тирозин-специфичные протеинфосфатазы быстро снимают фосфорилирование, а GAP индуцируют инактивацию активированных Ras за счет гидролиза GTP до GDP. Поэтому для стимуляции дифференцировки или пролиферации клеток, эти короткоживущие сигнальные процессы должны передать сигнал в ядро для изменения профиля экспрессии генов. Для этого используются белки митоген-активируемого протеинкиназного модуля (Mitogen-activated Protein Kinase Module, MAPK модуль) [69, 99, 336]. Белки MAPK высококонсервативные и практически идентичны у всех организмов от дрожжей до человека. MAPK модуль включает три белка, являющихся протеинкиназами. Первый компонент, который активирует Ras, называется киназой MAP-киназы (MAPKKK), которая фосфорилирует и активирует MAPKK, которая фосфорилирует и активирует MAP-киназу (MAPK). У млекопитающих эти киназы называются: Raf (= MAPKKK), Mek (= MAPKK) и Erk (= MAPK). Для разделения ответов от разных рецепторов используются каркасные белки, предотвращающие пересечения между MAP-киназными модулями, что позволяет одновременно функционировать, по крайней мере, 5 параллельным MAP-киназным модулям. В этих модулях содержится не менее 7 Raf, 7 Mek и 12 Erk [69, 99, 222, 253].

Белки Raf (A-Raf, B-Raf и C-Raf) обычно находятся в цитозоле, фосфорилированы по 259 и 621 позициям серина, связаны с ингибиторным

белком 14-3-3. Белки Raf содержат три консервативные области: консервативную область 1 (CR1), CR2 и CR3. Протеинкиназный домен локализован в области CR3 на С-конце, в то время как области CR1 и CR2 - на N-конце и регулируют активность белка. В активации белка Raf участвует целый комплекс молекул, включая GTP-Ras, РНВ (прохибитин) и PP2A (протеинфосфатаза 2A). Обязательным в активации Raf является его взаимодействие с прогибитином, который повсеместно экспрессируется и локализуется в основном в митохондриях, а также в цитоплазме и ядре [327, 339]. Показано, что взаимодействие РНВ с Raf необходимо для его фосфорилирования в 338 позиции серина и 341 позиции тирозина, диссоциации от белка 14-3-3 и заякоривания на мембране клетки вблизи белков Ras. Протеинфосфатаза 2A (PP2A) способна дефосфорилировать серин в 259 и 621 регуляторных позициях Raf, облегчая диссоциацию 14-3-3 и способствуя взаимодействию с белками Ras. Активный Ras (Ras-GTP) связывается с RBD (связывающий домен Ras) в области CR1 Raf с очень высокой аффинностью инициирует его фосфорилирование в 338 позиции серина и 341 позиции тирозина, которые необходимы для его полной активации. После активации Raf образуют гетеродимеры, которые взаимодействуют с каркасным белком KSR (Kinase suppressor of Ras). KSR1 является белком, объединяющим вместе все модули MAPK. Raf фосфорилирует MEK1/2 в 217 и 221 позиции серина по MAPKK-типичному мотиву Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr в активационной петле. Активированный MEK1/2 взаимодействует со своим единственным известным субстратом – ERK1/2 [336, 376]. MEK1/2 – единственные протеинкиназы с двойной специфичностью, которые могут фосфорилировать как регуляторные остатки Thr в 202 позиции, так и в 204 Tyr ERK1/2, вызывая его активацию [222, 376].

На сегодняшний день идентифицировано около 200 различных субстратов ERK1/2, расположенных как в цитоплазме (например, PLA2, RSK), так и в ядре (например, Elk1, c-Fos и c-Jun). Субстраты ERK1/2 в цитозоле включают белки SOS, которые фосфорилируются после стимуляции фактором роста. Фосфорилирование SOS дестабилизирует комплекс SOS-GRB2, инициируя его

диссоциацию с плазматической мембраной и блокируя активацию Ras. Еще один цитозольный субстрат ERK1/2 — это рецептор EGF, который фосфорилируется в 669 позиции Thr, и, таким образом, ингибируется его киназная активность. Наконец, ERK1/2 фосфорилируют фосфатазу MKP (MAPK phosphatases), что снижает деградацию этих ферментов в протеосомах и способствует дефосфорилированию и инактивации самого ERK1/2 [99, 347, 339]. Все рассмотренные субстраты осуществляют обратную отрицательную регуляцию сигнального пути MAPK/ERK. ERK1/2 способны активировать цитозольные серин/треониновые протеинкиназы - MAPK-взаимодействующие киназы 1 (MNK1) и MNK2, фосфорилируя их по 197 Thr и 202 Thr. MNK1 и, вероятно, MNK2 активируют фактор инициации у эукариот - 4E (eIF-4E) путем его фосфорилирования по 209 Ser. Считается, что фосфорилирование eIF-4E по Ser209 усиливает сродство этого фактора инициации к 7-метилгуанозиновым кэп-структурам, направляя рибосомы к 5'-концам мРНК и повышая эффективность трансляции [237]. ERK1 и ERK2 косвенно регулируют транскрипцию генов путем фосфорилирования рибосомальной протеинкиназы S6 (RSK), семейства широко экспрессируемых серин/треониновых киназ, активируемых в ответ на митогенные стимулы, включая факторы роста и эфиры фобола. Сайты фосфорилирования RSK1 включают 573 Thr, 380 Ser и 221 Ser [297, 376]. Активные RSK, по-видимому, играют важную роль в регуляции транскрипции, перемещаясь в ядро и фосфорилируя такие факторы, как c-fos по 362 Ser, SRF (serum response factor) по 103 Ser, CREB по 133 Ser, Elk-1 (Ets-like Gene 1) по 383 Ser и др. ERK осуществляет активацию фосфолипазы A2 (PLA2), которая расщепляет мембранные фосфолипиды с образованием арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза эйкозаноидов. После активации ERK1 и ERK2 могут осуществлять транслокацию в ядро и фосфорилировать множество мишеней, включая факторы транскрипции, митоген и стресс-активируемые протеинкиназы (MSK, Mitogen- and Stress activated Protein Kinases) [237, 249, 376].

Другой прямой мишенью ERK является продукт протоонкогена c-Myc (Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog). Myc – это короткоживущий фактор

транскрипции, который активирует около 15% генов. Активация ERK1/2 способствует фосфорилированию Vim и Vid, вызывая их протеасомную деградацию, таким образом ингибируя апоптоз. В отдельную группу выделяют сигнальные пути, индуцируемые стрессом и включающие активацию JNK и p38, обе молекулы могут активироваться при передаче сигнала от белков суперсемейства Ras [99, 237, 336].

1.2.1 RAS – одна из ключевых мишеней сигнального пути

Ras-белки впервые были открыты как трансформирующие продукты группы, связанной с ретровирусами, наиболее часто они упоминаются как протоонкогенные продукты, так как их гиперактивация, обусловленная мутационными изменениями, приводит к активации пролиферативных процессов и злокачественному перерождению клеток. Ras-белки участвуют в стимуляции клеточного деления факторами роста (Рисунок 2) [303].

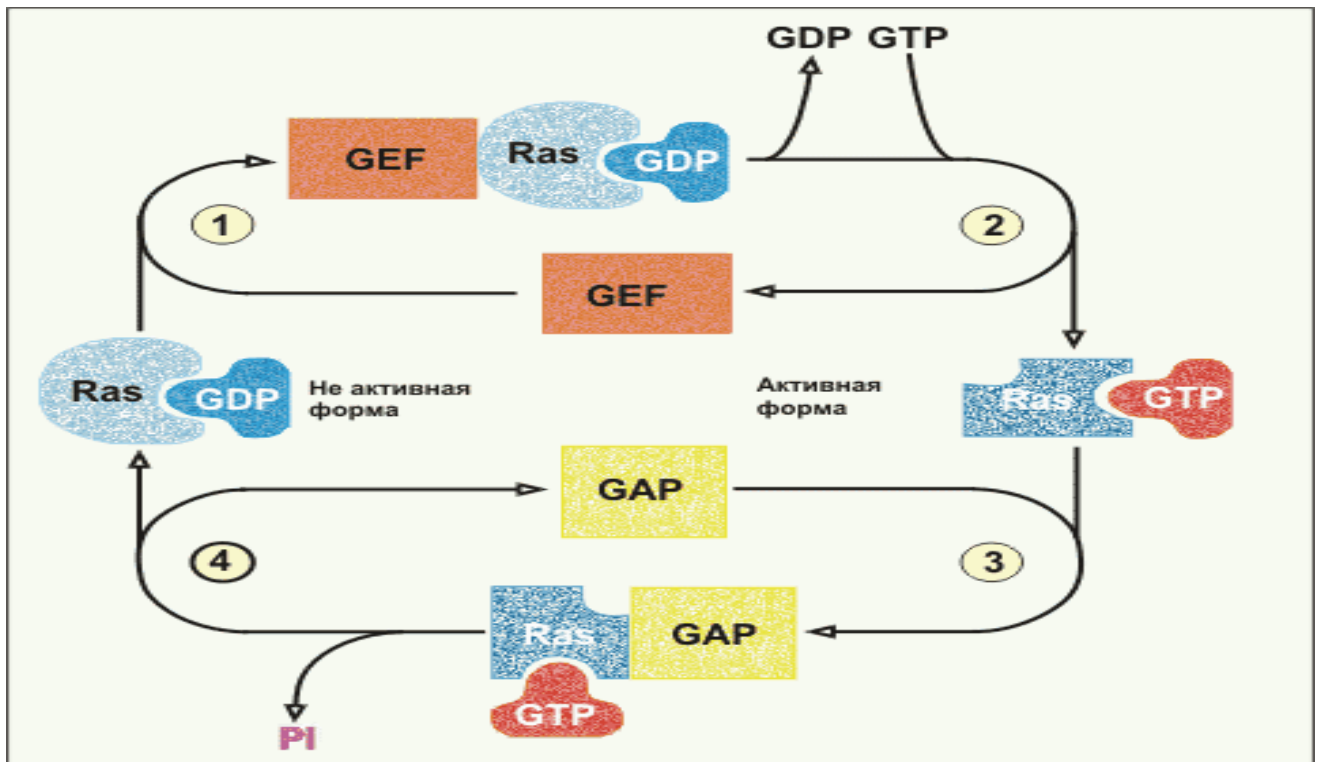


Рисунок 2 – Связывание фактора роста с рецептором и активация Ras-GTP [303]

Все они являются одноцепочными полипептидами, длиной в 189 аминокислотных остатков, и связаны с плазматическими мембранами клеток с

помощью посттрансляционных липидных участков [249, 297, 348]. Ras-белки — это GTP-азы, связываясь с гуаниновыми нуклеотидами (GTP и GDP) они работают в качестве молекулярных переключателей: «включено» — когда белок связан с GTP, и «выключено» — когда белок связан с GDP [348]. Относительно GTP-азной активности как функции, усиление которой ведет к трансформации клеток, необходимо отметить, что в чистой системе скорость гидролиза чрезвычайно мала ($K=5 \cdot 10^{-4}$ /сек). Однако в клетке существуют белки, взаимодействующие непосредственно с Ras, и при этом скорость гидролиза возрастает многократно (на 5 порядков). Эти активирующие GTP-азу (GAP) белки способны подавить даже митогенное действие фактора роста. Поэтому, уменьшая активность GAP белка, можно вызвать митогенный сигнал, что и происходит в T- и B-лимфоцитах и адипоцитах. Механизм активации белком GAP GTP-азы состоит в образовании временного стехиометрического комплекса, т.е. GAP-Ras. Неонкогенные формы (с- Ras) представлены во всех клетках, являясь регуляторами их роста и дифференцировки [85, 203, 312].

Переход Ras белка из неактивной формы в активную происходит в две стадии и с участием двух белков:

- 1 - Гуанин-нуклеотид обменивающий фактор (GEF) вызывает диссоциацию GDP от Ras.
- 2 - GTP спонтанно связывается, а GEF диссоциирует, освобождая активный комплекс Ras-GTP. Гидролиз GTP в сотни раз усиливается активирующим GTP-азу белком GAP [222, 327].

Несмотря на то, что Ras самый распространенный онкоген опухолей человека, на него не действует ни один из зарегистрированных в настоящее время противоопухолевых препаратов и до сегодняшнего дня эта мишень была недоступна для препаратов «to be thought of as undruggable» [336]. В ряде работ подчеркивается, что мутации Ras, приводящие к гиперактивации сигнального пути MAPK/ERK, встречаются в 25% всех опухолей человека [126, 293]. Хотя суммарная доля мутаций генов Ras-ГТФаз, которые приводят к гиперактивации сигнального пути, наблюдаются в 25% всех случаев

онкологических заболеваний человека, для рака определенных локализаций это процент существенно выше. Например, для рака поджелудочной железы данный показатель достигает 90% [310, 324]. Такая же высокая частота мутаций Ras наблюдается для нейробластом и некоторых других форм рака [222]. Так, при одной из наиболее распространенных форм рака – колоректальном раке, частота мутаций Ras достигает 60% [293]. Заболеваемость колоректальным раком в России составляет по данным на 2011 год 40 случаев на 100 тыс. человек, а смертность 30 случаев на 100 тыс. человек [244]. В качестве таргетной терапии данного вида рака применяют цетуксимаб (моноклональное антитело против EGFR) и бевацицизумаб (моноклональное антитело против VEGF), важно подчеркнуть, что наличие мутаций гена KRAS, делает таргетную терапию неэффективной. Как и в случае колоректального рака мутация гена KRAS, которая наблюдается в 20-25% случаев аденокарциномы легкого, делает таргетную терапию против других биомисшеней Ras каскада неэффективной [81, 134]. Основными таргетными препаратами для терапии аденокарциномы легкого являются цетуксимаб, эртонилиб, gefитиниб (ингибиторы EGFR), бевацицизумаб и кризотиниб (ингибитор мутантной формы ALK-киназы) [216, 289].

Кроме того, показано, что применение ингибиторов BRAf – при наличии Ras мутаций приводит к парадоксальной активации CRAf и MAPK сигнального пути и они вызывают активацию роста опухоли, вместо ее торможения [302, 310]. Ингибиторы Braf (такие как Zelboraf и похожие на него) вызывают образование стабильных комплексов-димеров BRAf-CRAF и CRAf-CRAF. Формирование этих комплексов селективно усиливает образование мембранных нанокластеров онкогенных K-Ras и N-Ras, которые, в свою очередь, приводят к активации MAPK каскада [64, 332].

Таким образом, применение Braf ингибиторов ограничено для пациентов с Ras мутациями [134]

Все вышеперечисленное показывает важность Ras как молекулярной мишени при онкологических заболеваниях, а отсутствие эффективных ингибиторов для ее регулирования стало предметом большого числа

исследований в последние годы. На активный интерес исследователей, работающих в областях молекулярной медицины и фармакологии, указывает возрастающее число публикаций по данной теме, особенно за последние пять лет [216, 230, 289, 332].

1.2.2 Структура и функции белка Ras

RAS - это белок, прикрепленный к внутренней стороне клеточной мембраны. Во всех эукариотических клетках идентифицированы гомологи RAS, которые играют критически важную роль в различных цепях передачи сигналов из внеклеточного пространства [281].

По сравнению с молекулами, с которыми они взаимодействуют, *ras*-белки являются сравнительно небольшими и несложно устроенными. Обычно они содержат около 190 аминокислотных остатков ($M_r=21\text{kDa}$), свернутых в единый GTP-азный домен. Сравнение последовательностей *p21* человека выявило четыре области, отличающиеся по степени своей консервативности. Первая, являющаяся N-концевой областью и составляющая примерно одну треть белковой молекулы, является наиболее консервативной. Вторая и третья области имеют несколько большую дивергенцию, но все еще сохраняют 85% гомологии между любыми двумя *ras*-генами, в то время как C-концевая последовательность *p21* отличается высокой степенью вариабельности [170, 186]. Для *c-Ki-ras2* гена описаны два альтернативных четвертых кодона, обозначаемых IVB и IVA, трансляция с которых приводит к образованию полипептидов в 188 и 189 аминокислотных остатков, соответственно [135, 289].

К суперсемейству Ras относится большое количество структурно сходных белков человека. Белки этого семейства участвуют в передаче сигнала от мембраны к ядру по каскаду Ras-Raf-МАРК-Erk от мембранных рецепторов, таких как EGFR и др.

Исторически, гены H-RAS и K-RAS были открыты первыми по их опухолеродным свойствам в составе вируса саркомы [64, 342]. Трансформирующие свойства генов Ras при возникновении опухолей человека

была впервые продемонстрирована в 80-е годы прошлого века [169, 282, 333]. Позже был открыт третий ген группы Ras- N-RAS впервые идентифицированный в клетках нейробластомы человека [332].

Проведенный в последние годы анализ трехмерных структур Ras показал, что область связывания GDP - G-домен делиться на две части [97]. Первая часть (аминокислотные остатки 1-86) идентичная у всех Ras белков содержит участок связывания нуклеотида и может быть разделена на P-петлю (остатки 10-17), и участки, получившие название переключатель I (остатки 30-40) и переключатель II (остатки 60-76) – участки. Вторая часть G-домена является эффекторной областью и обеспечивает регуляторных белков [51, 97, 404].

Эффекторная часть содержит несколько мембран-взаимодействующих областей, которые обуславливают аллостерическое связывание элементов активного центра и мембраны. Эта часть на 90% идентична между различными формами Ras, с максимальными различиями аминокислотных остатков в участке белок-мембранного взаимодействия, что, по-видимому, обеспечивает специфичность взаимодействий KRAS, NRAS и HRAS с мембраной, а также особенности их коммуникативных связей [278, 316, 367].

Млекопитающие имеют три почти идентичных гена RAS кодирующих соответствующие белки: ген N-Ras, ген Ha-Ras и ген Ki-Ras. Названия двух последних происходят от штаммов вируса, в которых найдены гомологичные вирусные онкогены: Harwey и Kirsten. Гомолог третьего в вирусах не найден. И структуры, и функции этих белков высоко консервативны в эволюции, так, например, белки млекопитающих могут заменять RAS белки в дрожжах [75, 186].

В настоящее время известно, что геном человека содержит 3 гена семейства Ras и четыре белковых продукта, несмотря на то, что все семейство включает 36 различных вариантов [135, 216, 242].

H-RAS. Ген H-RAS локализован на коротком плече хромосомы 11. Ген содержит 6 экзонов и имеет размер 6,5 kb. Известно 2 сплайс варианта гена. Наиболее распространенная форма – p21 H-ras и более редкая – p19 H-ras, которая рассматривается как негативный регулятор p21 H-ras [74, 194].

Наиболее частые мутации гена H-RAS наблюдаются в кодонах 12, 13 и 61. Мутации в 1-м и 2-м экзонах этого гена описаны для широкого круга опухолей [281].

K-RAS. Ген K-RAS локализован на p-плече хромосомы 12. Этот ген состоит из 6 экзонов. Известно 2 сплайс варианта K-ras 4A и K-ras4B, которые отличаются отсутствием экзона 6 в сплайс варианте K-ras4B. Активирующие мутации для K-ras часто встречаются при немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке и раке поджелудочной железы [74, 170, 243]. Эти мутации, также как и мутации H-Ras касаются кодонов 12 и 13 [280, 372], при этом большинство мутаций K-ras имеют соматическую природу и редко встречаются наследственные варианты [302].

N-RAS. N-RAS ген локализуется на 1-й хромосоме в позиции 13.2, его мутации были первоначально описаны при нейробластоме. Соматические мутации N-RAS с более низкой частотой встречаются при некоторых формах злокачественных новообразований (меланома, рак лёгкого, колоректальный рак), чем K-RAS [391]. Одновременное мутирование N-RAS и BRAF гена часто встречается при меланомах и ассоциируется с высоким риском метастазирования. Мутации в 13 и 61 кодоне N-RAS описаны при лимфобластной лейкозе и при синдроме Нунана [60, 322].

1.2.3 Пути активации Ras

Нормальный Ras преимущественно находится в неактивной GDP-связанной форме (D-Ras), в то время как онкогенный Ras конститутивно активен, поскольку связан негидролизуемым GTP. Домены, гомологичные RasGAP, найдены в NF1 и bcr (breakpoint cluster region gene). Домен белка нейрофиламентов, кодируемого геном NF1, имеет 30% гомологию с rasGAP. Точечные мутации, которые ингибируют GTPазную активность фибромина были найдены в спонтанных опухолях мозга - нейрофиброматозах типа 1. Теперь известно, что NF1 является геном-супрессором опухолей. Как и сам RAS белок, так и системы его регуляции

высококонсервативны, как показывает анализ белков. Например, у дрожжей GAP функцию выполняют белки IRA1 и IRA2 [151, 199].

После гидролитического превращения GTP в GDP RAS снова инактивируется. Сигнал прерывается, а для восприятия нового сигнала, если он еще существует вне клетки, цикл реактивации должен быть повторен. Скорость реактивации резко увеличивается при содействии промежуточных белков, в частности, SOS-белка активатора Ras. Кроме SOS-белка такой катализ могут осуществлять и другие полипептиды. Известно множество эффекторов RAS [51, 333]. Они предпочитают взаимодействовать с ним, когда он связан с GTP. Некоторые из эффекторов также были идентифицированы, как онкобелки. Это Ser/Thr киназа RAF1, которая располагается следом за RAS на пути передачи сигнала. В результате запускается в действие каскад MAP киназ [51, 75, 391].

Следует выделить несколько позиций аминокислот, необходимых для понимания функционирования данных белков. Такими аминокислотными остатками являются Gly12 - его замена на Val или Asp ведет к злокачественной трансформации; Ser17-->Asn - доминантный негативный тип мутаций, ведущий к блокировке передачи сигналов. Также важны аминокислотные остатки 32-40, т.н. эффектор-связывающий домен, мутации в котором (Tyr40-->Lys, Thr35-->Ala и даже Asp38-->Glu) снижают эффективность работы p21ras [238, 262].

Активация Ras происходит за счёт обмена GDP на GTP под действием гуаниннуклеотидобменных факторов (GEF), активированных мембранными тирозинкиназами-рецепторами, например, EGFR. В активном состоянии Ras связан с молекулой GTP, а в неактивном — с GDP [126, 376]. Активный комплекс Ras-GTP взаимодействует с серин/треонин-киназой Raf. Основные сигнальные пути Ras показаны на рисунке 3.

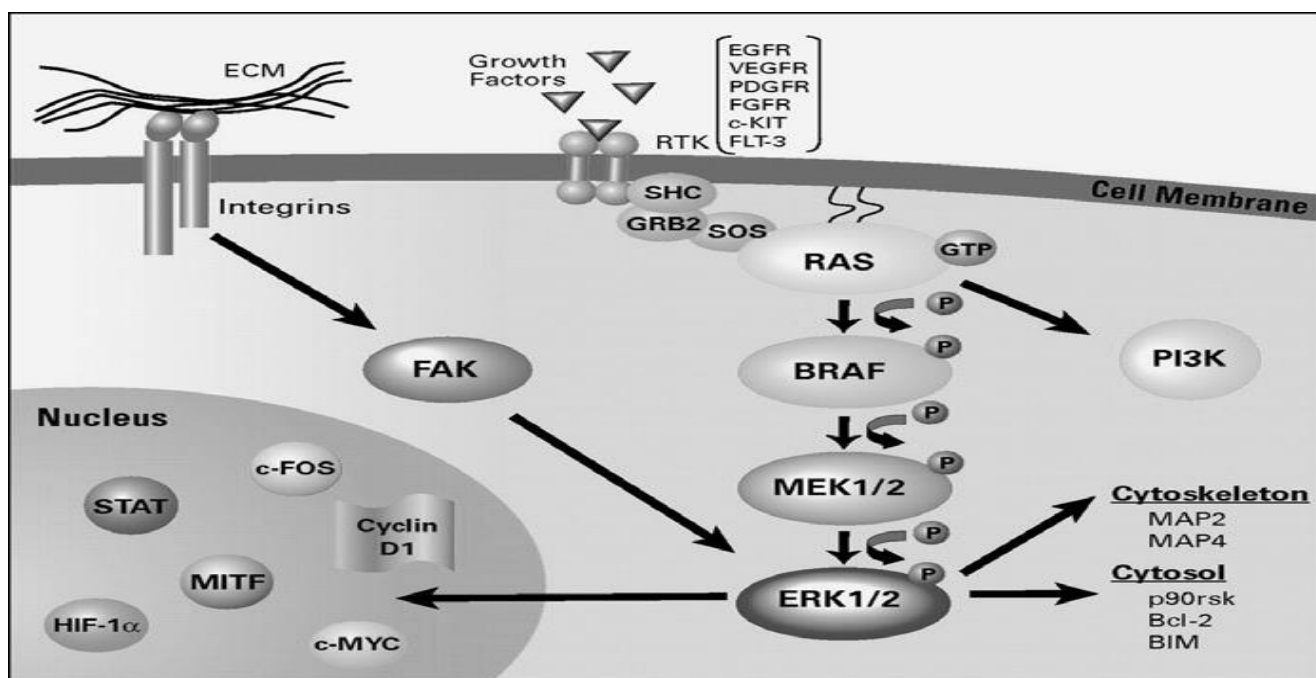


Рисунок 3 – Сигнальный путь активации Ras и последующая передача сигнала [359]

В нормальных неделящихся клетках Ras-белки присутствуют преимущественно в GDP-связанной «неактивной» форме. Однако в ответ на ростовую стимуляцию сывороткой или факторами роста в клетках может повышаться уровень GTP-связанной «активной» формы белка [154].

Продукты онкогенов с повышенной тирозинкиназной активностью оказывают сходное действие [154, 201]. Эти данные указывают на важную роль GTP-связанных «активных» форм Ras-белка для нормальной клеточной пролиферации и участия в трансдукции сигналов, передающихся с активированных рецепторов и мембранных тирозинкиназ [94, 126, 238].

GTP-азная активность суперсемейства Ras- и Ras-родственных белков в клетке строго регулируется. Белки находятся в «активной» форме и проводят сигналы, когда они связаны с GTP, и «неактивной», когда связаны с GDP [102, 325]. GTP-связанная форма медленно переходит в GDP-связанную форму за счет присущей белку способности гидролизовать GTP. Низкая собственная GTP-азная активность нормальных Ras-белков может быть сильно увеличена активирующими регуляторными белками GAPs (GTPase-activating proteins) [341, 361]. Активность GAP в свою очередь также регулируется. Показано, что

активация протеинкиназы С (важного компонента в передаче внутриклеточных сигналов), имеющая место при стимуляции деления Т-лимфоцитов, понижает активность GAP [132, 166]. Следствием уменьшения GAP-активности является снижение скорости гидролиза GTP до GDP и присутствие в клетках преимущественно GTP-связанной формы p21, активно проводящей митогенные сигналы. С другой стороны показано, что активность GAP может значительно повышаться при увеличении плотности посева клеток, обладающих контактным ингибированием [28, 74]. В результате этого активируется GTPазная активность Ras, что приводит к преимущественному содержанию GDP-связанной «неактивной» формы белка [28, 325].

Мутантные онкогенные Ras-белки также взаимодействуют с GAP [341], однако GAP не увеличивает их GTPазную активность [360]. С целью определения роли GAP в индуцированной *ras*-генами трансформации было исследовано влияние гиперэкспрессии GAP на злокачественную трансформацию, вызываемую гиперэкспрессией нормального (*c-Ha-ras1*) и мутантного (*v-Ha-ras*) p21 [278]. Было найдено, что GAP супрессирует трансформацию NIH 3T3 клеток нормальным p21, но не мутантным. Эти результаты говорят в пользу гипотезы о том, что GAP функционирует как негативный регулятор нормального Ras-белка [40, 360].

Помимо белков, активирующих GTPазную активность Ras, существуют регуляторные пептиды, осуществляющие активацию обратного процесса - замещения GDP на GTP. Эти белки именуется GEFs (guanine-nucleotide-exchange factors), или GNRPs (guanine-nucleotide-releasing proteins), или GDSs (guanine-nucleotide-dissociation stimulators) [272, 318]. GEFs ускоряют нуклеотидный обмен путем ассоциации с GDP-связанной формой Ras-белков. При этом GDP быстро диссоциирует и Ras-белок немедленно связывается с GTP, что сопровождается диссоциацией GEF и переходом Ras-белка в «активную» форму. Потеря активности GEFs сходна по своему эффекту с отсутствием Ras-белков, что говорит о необходимости данных регуляторных белков для нормального функционирования Ras. Такое влияние потери активности GEFs может быть

устранено в результате «онкогенных» мутаций Ras-белков или в некоторых случаях при утрате активности GAPs [165, 318].

Третья группа регуляторных белков GDIs (guanine-nucleotide-dissociation inhibitors) способна ингибировать как процесс замещения GDP на GTP, так и активность GAPs [114, 383]. В нормальных неделящихся клетках Ras-белки присутствуют преимущественно в GDP-связанной «неактивной» форме. Однако, в ответ на ростовую стимуляцию сывороткой или факторами роста в клетках может повышаться уровень GTP-связанной формы белка [318]. Продукты онкогенов с повышенной тирозинкиназной активностью оказывают сходное действие [114, 318]. Эти данные указывают на важную роль GTP-связанных «активных» форм Ras-белка для нормальной клеточной пролиферации и на их участие в трансдукции сигналов, передающихся с рецепторов и мембранных тирозинкиназ.

Таким образом, существует сложная система регуляции GTPазной активности Ras-белков, участвующих в контроле жизненно важных клеточных процессов, таких как пролиферация и дифференцировка.

1.3 Белки клеточного цикла, их роль в физиологических процессах, изменения при онкологических заболеваниях и возможности использования в качестве мишеней при создании противоопухолевых препаратов

Митогенный импульс, полученный клеткой и переданный через систему сигнальных путей, приводит к активации процессов клеточного деления. Клеточный цикл или цикл деления клетки, это высокоорганизованный и строго регулируемый процесс, который обеспечивает удвоение генетического материала и последующее деление клеток [15, 23]. Регуляция прохождения клеточного цикла включает в себя митогенную стимуляцию, обеспечивающую необходимую пролиферативную активность, а также сигналы и взаимодействие белков, контролирующих процессы репарации и генетическую целостность во время клеточного деления. Баланс между этими механизмами и их строгий контроль

позволяют исключать ошибки деления и своевременно элиминировать клетки с различными нарушениями целостности генетического материала [295, 341].

Клеточный цикл включает четыре фазы (G0/G1, S, G2 и M), прохождение которых регулируются путем последовательной активации каскада циклинзависимых киназ (CDK), функциональная активность которых, в свою очередь, регулируется соответствующими циклинами [219, 239]. Активность CDK, участвующих в регуляции клеточного цикла, строго контролируется; она индуцируется митогенными сигналами и может быть ингибирована активацией контрольных точек клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК или соответствующие сигналы (Рисунок 4) [163].

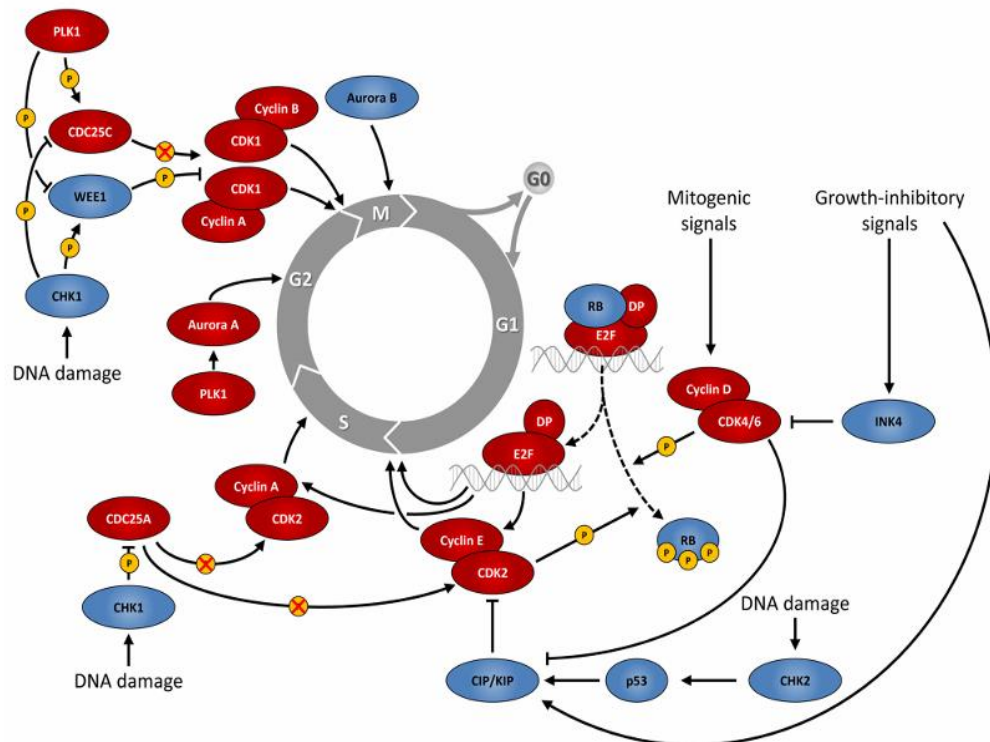


Рисунок 4 – Основные регуляторные белки клеточного цикла.

Митогенные сигналы активируют комплексы циклинов и циклинзависимых киназ (CDK), которые способствуют переходу из фазы G1 в фазу S, главным образом, путем фосфорилирования белка ретинобластомы (RB) и последующей активации транскрипции с помощью семейства транскрипционных факторов E2F [18, 163, 167]. Основные антимитотические факторы, препятствующие пролиферации и вызывающие остановку деления в точке рестрикции G1-S

относятся к семействам INK4 и CIP/KIP [66, 326]. Прохождение S фазы и переход из фазы G2 в митоз (фазу M) также контролируется комплексами циклин-CDK (Циклин A-CDK2, Циклин B- CDK1), а также множеством других белков, таких как Polo-подобная киназа 1 (PLK1) и киназы семейства Aurora (Aurora A/B). В зависимости от внешних факторов или внутренних сигналов, клетки могут вступать в обратимую или постоянную стадию остановки клеточного цикла (фаза G0). При наличии генетических повреждений и их обнаружении системой сигнальных белков возможны остановки прохождения клеточного цикла в точках рестрикции (CHK1 и CHK2) [88, 213].

В злокачественных новообразованиях отмечается аберрантная активность клеточного цикла, возникающая вследствие мутаций в сигнальных путях передачи митогенных или пролиферативных импульсов, либо в результате генетических повреждений в генах, кодирующих белки клеточного цикла. Аберрантная активация CDK, которая часто наблюдается при онкологических заболеваниях, обуславливает целесообразность разработок синтетических ингибиторов CDK в качестве новых перспективных противораковых препаратов [214].

1.3.1 Белки клеточного цикла и их роль в физиологических процессах и при онкологии/развитии опухоли. Сигнальный путь пролиферации CDK4/CDK6-RB

Во многих тканях взрослого человека клетки находятся в состоянии остановки клеточного цикла (фаза G0), которая может быть, как временной (покой), так и постоянной (при терминальной дифференцировке или старении). Покоящиеся клетки могут быть повторно введены в клеточный цикл посредством стимуляции митогенными факторами, которые, в свою очередь, активируют каскады внутриклеточных сигнальных путей пролиферативной активации и воздействуют на CDK4 и CDK6, вызывая запуск прогрессии клеточного цикла и переход из G0/G1 в фазу S, в которой происходит репликация ДНК (Рисунок 5) [10].

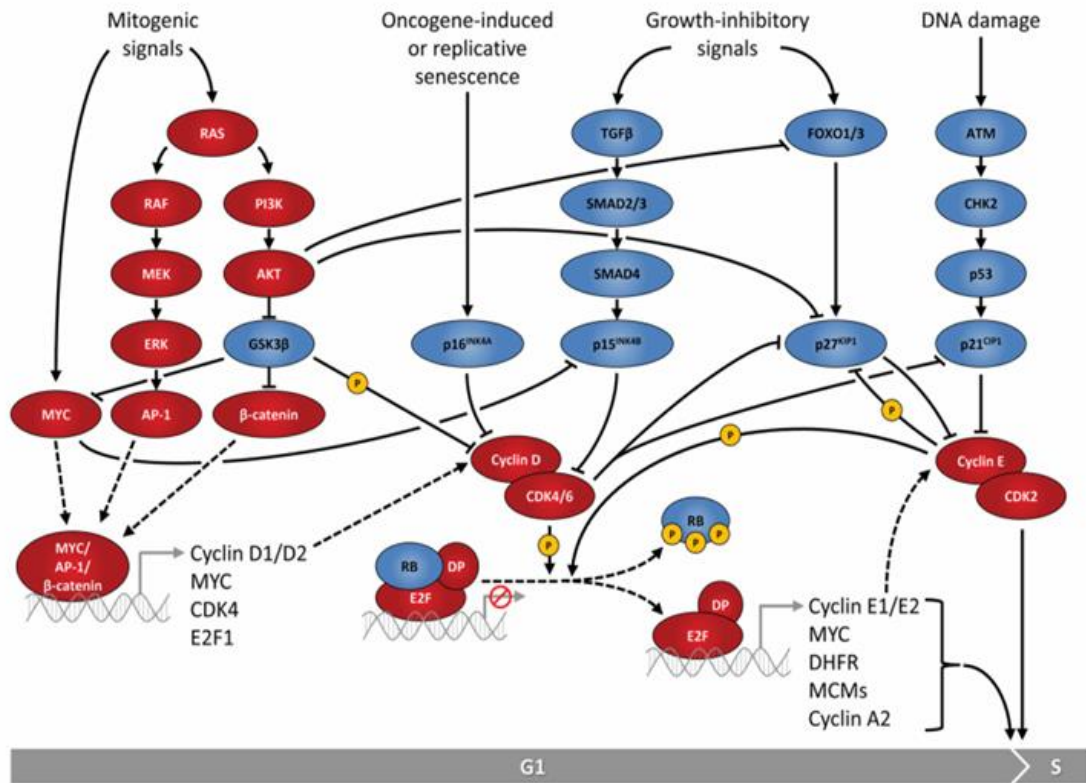


Рисунок 5 – Регуляция переходов фаз клеточного цикла G1-S и G2-M [274]

Примечание - Запуск клеточного цикла инициируется митогенными стимулами, которые активируют сигнальные пути, такие как, путь RAS, в результате передачи по ним сигнала происходит стимуляция (изменение экспрессии) факторов транскрипции, MYC, AP-1 или β -катенин, что приводит к индукции ряда белков клеточного цикла, включая циклины D-типа. Образование активных комплексов циклинов D-типа и циклин-зависимых киназ (CDK) 4 и 6 запускает фосфорилирование белка RB (ретинобластомы), ингибирование данного процесса осуществляется белками семейства INK4 ($p16^{INK4A}$ и $p15^{INK4B}$) в ответ на сигналы, ингибирующие пролиферацию или индуцирующие старение, такие как трансформирующий фактор роста β (TGF β). Фосфорилирование RB приводит к активации фактора транскрипции E2F, который способен активировать транскрипцию других генов, стимулирующих S-фазу, включая циклины E1 и E2. При отсутствии такой стимуляции, комплексы циклин E-CDK2 находятся в неактивном состоянии за счет воздействия на них ингибиторов $p27^{KIP1}$ и $p21^{CIP1}$.

Активация циклин E-CDK2 включает несколько механизмов, включая секвестрацию/отщепление $p27^{KIP1}$ и $p21^{CIP1}$ комплексами циклин D-CDK4/6 и фосфорилирование $p27^{KIP1}$ CDK2 киназой. Активные комплексы циклин E-CDK2 дополнительно фосфорилируют RB, а также многие другие мишени, достигая своей максимальной физиологической активности при вступлении в S-фазу

CDK4 и CDK6 являются высоко гомологичными серин/треониновыми киназами, экспрессия которых является тканеспецифичной, а уровень ее связан с пролиферативной активностью данного вида ткани. CDK4 и CDK6 отвечают за фосфорилирование целого набора белков, что в значительной степени

обуславливает их значимость [176]. Экспериментальные исследования по нокауту генов подтвердили значительную избыточность синтеза CDK4 и CDK6 в большинстве тканей [58, 124]. Также в ряде исследований было показано, что CDK6 обладает некоторыми уникальными, циклин-независимыми транскрипционными функциями в гемопоэтических клетках [176]. Активность CDK4 и CDK6 имеет важное физиологическое значение и контролируется несколькими механизмами: положительно — путем ассоциации с циклинами D-типа (D1, D2 и D3) и отрицательно — путем связывания с ингибиторами семейства INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INKB}, p18^{INK4C} и p19^{INK4D}) [35, 162].

Комплексы циклин D-CDK4/6 способствуют прогрессированию клеточного цикла двумя основными механизмами. Во-первых, они высвобождают CDK2 из комплексов с их ингибиторами, секвестрируют p21^{CIP1} и p27^{KIP1} [225, 326]. Во-вторых, активные комплексы циклин D-CDK4/6 фосфорилируют различные клеточные мишени. Среди этих мишеней особое значение имеют белок-супрессор опухолей RB, а также ассоциированные с ним белки p107 и p130. Благодаря этому процессу факторы E2F получают возможность запускать транскрипцию большого числа генов. Эти гены играют ключевую роль в продвижении клеточного цикла: они участвуют в переходе клетки из фазы G1 в фазу S, обеспечивают репликацию ДНК, способствуют правильной организации хроматина, участвуют в сегрегации хромосом и обеспечивают прохождение контрольной точки, необходимой для сборки митотического веретена деления [225, 319, 346].

Среди транскрипционных мишеней E2F также есть циклины E1 и E2, которые связывают и активируют CDK2, что приводит к дальнейшему гиперфосфорилированию RB, тем самым инициируется положительная обратная связь. В дополнение к этим каноническим функциям контроля клеточного цикла было показано, что циклины D-типа, CDK4 и CDK6 выполняют ряд функций, некоторые из которых не имеют отношения к регуляции пролиферации [89], в метаболизме глюкозы, окислительно-восстановительных реакциях, метаболизме аминокислот, нуклеотидов и липидов [137]. На рисунке 6 показана регуляция переходов фаз клеточного цикла G2-M.

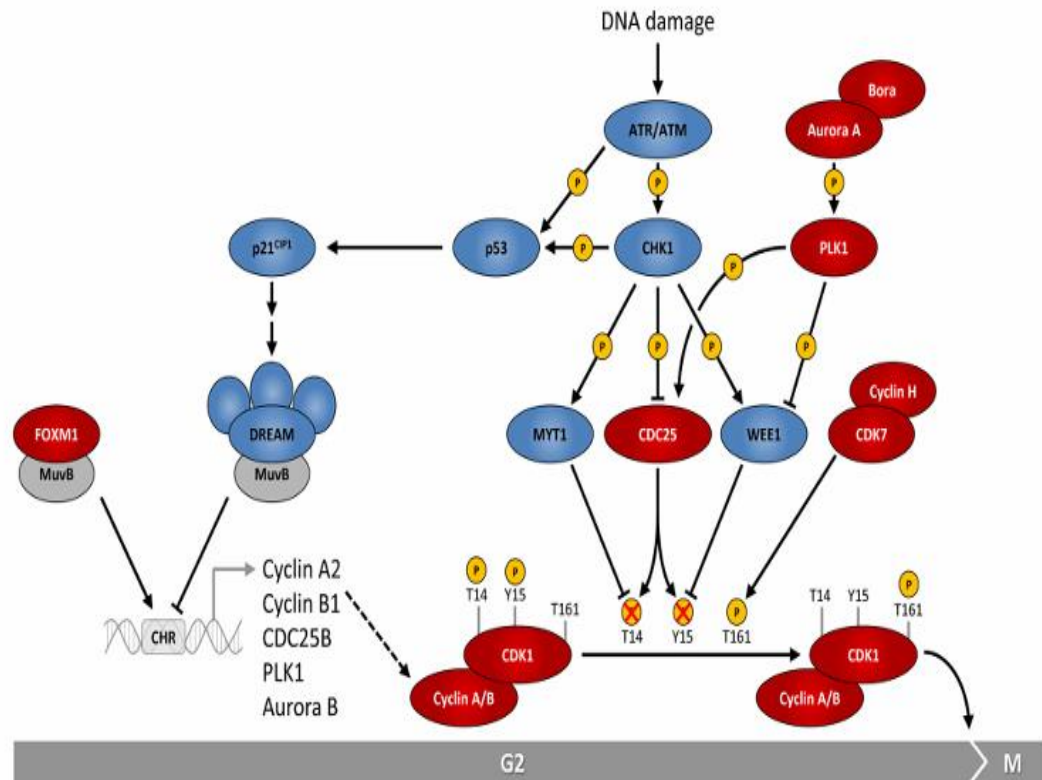


Рисунок 6 – Регуляция переходов фаз клеточного цикла G2-M [274]

Примечание - во время инициации фазы G2 комплекс MuvB ассоциируется с фактором транскрипции FOXM1 и связывает промоторы, содержащие элементы области гомологии генов клеточного цикла (CHR), тем самым индуцируя транскрипцию генов, необходимых для входа и прохождения митоза (фаза M), включая циклины B-типа. Активация CDK1 происходит за счет ее фосфорилирования в области Thr-161 комплексом циклин H-CDK7 (САК, CDK-активирующая киназа), а также за счет дефосфорилирования Thr-14 и Tyr-15 фосфатазами семейства цикла деления клеток 25 (CDC25), причем последний процесс дезактивируется/антагонизируется протеинкиназами MYT1 и WEE1. Активация комплексов циклин A/B-CDK1 необходима и достаточна для входа в митоз

1.3.2 Белки-ингибиторы циклинзависимых киназ и их роль в канцерогенезе

Активность циклинзависимых киназ (CDK), кроме уровня циклинов, также регулируется связью CDK с белками-ингибиторами циклинзависимых киназ (CKI). К ним относятся члены семейства INK4 ($p16^{\text{INK4A}}$, $p15^{\text{INK4B}}$, $p18^{\text{INK4C}}$ и $p19^{\text{INK4D}}$), которые связываются с CDK4 и CDK6 и блокируют их связь с циклинами D-типа, тем самым подавляя киназную активность CDK4 и CDK6. CKI из семейства CIP/KIP ($p21^{\text{CIP1}}$, $p27^{\text{KIP1}}$ и $p57^{\text{KIP2}}$) связываются со всеми комплексами CDK и ингибируют киназную активность CDK2 и CDK1 [89, 206, 404]. Вследствие роли CKI в качестве отрицательных регуляторов клеточного цикла, ингибиторы циклиновых киназ могут являться естественными

ингибиторами опухолевого роста [404]. Экспрессия белков INK4, в частности p16^{INK4A} и p15^{INK4B} (кодируемых CDKN2A и CDKN2B), подавляется в опухолях человека в результате различных генетических нарушений: делеций, точечных мутаций или изменением метилирования промотора, что приводит к потере их функциональной активности.

Результаты ряда экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что при онкологических заболеваниях у человека нередко происходит снижение уровня белка p27^{KIP1}. Это связано с его ускоренной деградацией, и такое явление ассоциируется с неблагоприятным прогнозом выживаемости [70, 206]. При этом делеция его геномного локуса (*CDKN1B*) наблюдается лишь в небольшом количестве случаев [153].

1.3.3 Роль пути CDK4/CDK6-RB в развитии злокачественных новообразований

При онкологических заболеваниях мутации различных участков пути CDK4/6-RB встречаются с высокой частотой (Рисунок 7 А, Б, В) [274].

Например, ген циклина D1 (*CCND1*) представляет собой второй по частоте амплифицируемый локус среди всех онкопатологий [346]. *CDK4* амплифицируется в 50% глиобластом [319] и конститутивно активируется точечной мутацией (R24C), которая делает CDK4 нечувствительным к ингибированию членами семейства INK4 в меланомах [167]. Аналогичным образом, CDK6 активируется геномными транслокациями в лимфомах маргинальной зоны селезенки [163]. Кроме того, ген *CDKN2A* (который кодирует супрессоры опухолей p16^{INK4A} и p14^{ARF}) представляет собой наиболее часто делецируемый локус при онкологических заболеваниях различных локализаций, а его экспрессия обычно подавляется метилированием промотора [18]. Наконец, делеция гена ретинобластомы (*RBI*) часто встречается во многих типах опухолей и обеспечивает гиперпролиферацию независимо от активности циклина D-CDK4/6 [167].

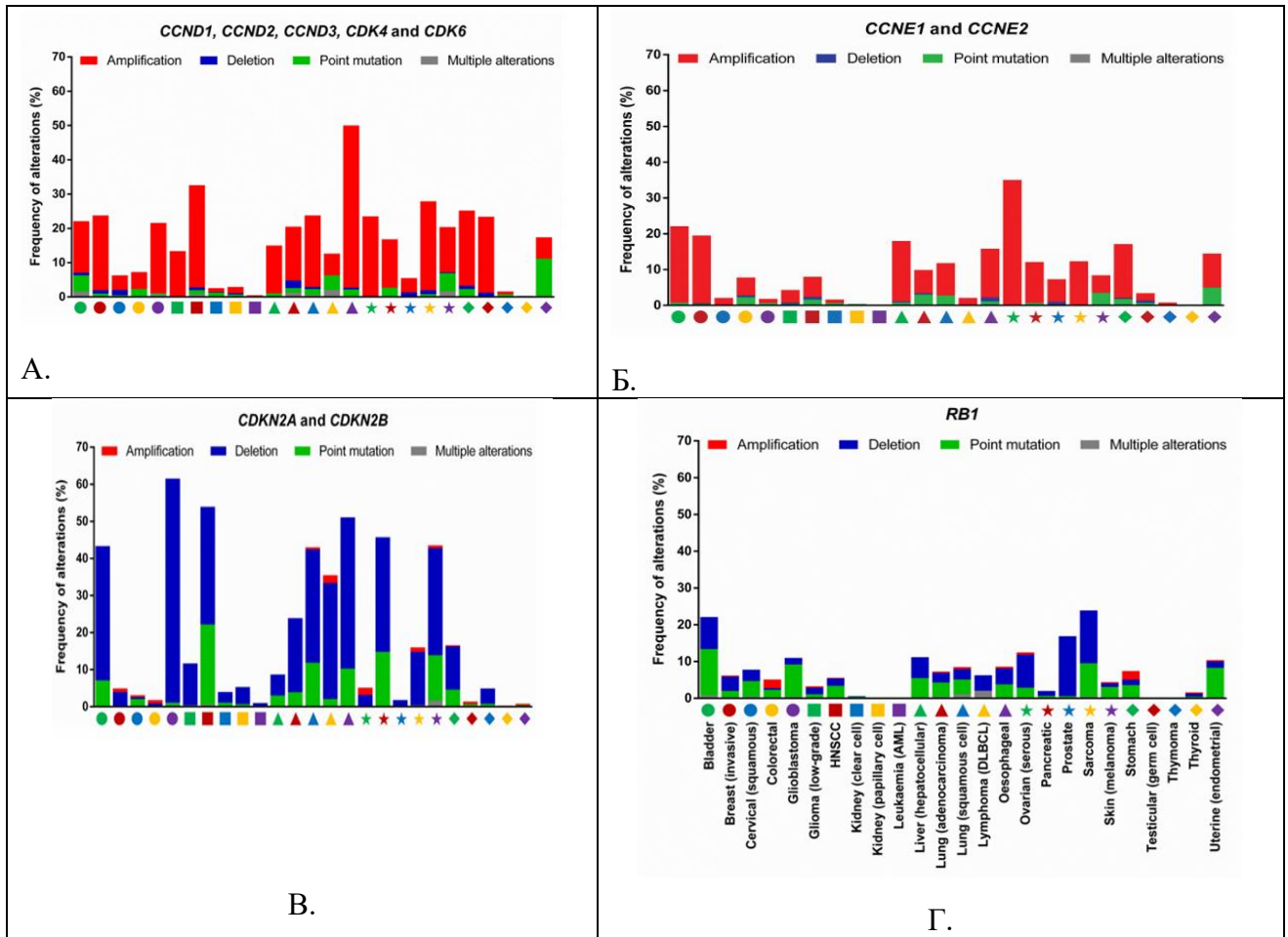


Рисунок 7 – Нарушение регуляции белков клеточного цикла при онкологических заболеваниях человека [274]

Примечание - А: Изменения генов циклина D1 (*CCND1*), D2 (*CCND2*), D3 (*CCND3*) и циклинзависимых киназ 4 (*CDK4*) и 6 (*CDK6*); Б: Изменения генов циклина E1 (*CCNE1*) и циклина E2 (*CCNE2*); В: Изменения генов, кодирующих ингибиторы CDK p15^{INK4B} (*CDKN2B*) и p16^{INK4A} (*CDKN2A*); последний локус также кодирует p14^{ARF} (белок альтернативной рамки считывания), который ингибирует убиквитинлигазу MDM2 и стабилизирует p53; Г: Изменения гена ретинобластомы (*RB1*). Прим. AML — острый миелоидный лейкоз; DLBCL — диффузная В-крупноклеточная лимфома; HNSCC — плоскоклеточный рак головы и шеи

На рисунке 7 представлены частоты изменений в генах, кодирующих основные регуляторы клеточного цикла в 25 типах онкологических заболеваний человека. Генетические изменения включают амплификации (красные столбцы), делеции (синие столбцы), точечные мутации (зеленые столбцы) и множественные изменения (серые столбцы). Каждый тип рака обозначен символом с уникальной формой и цветом под графиком (условные обозначения раскрыты на рисунке 7 Г) [274].

CDK2 активируется посредством ассоциации с циклинами E- или A-типа. В отсутствие митогенной стимуляции комплексы циклина-CDK2 ингибируются посредством ассоциации с такими ингибиторами, как p27^{KIP1} или p21^{CIP1}. Во время прохождения поздней G1 фазы активность CDK2 увеличивается в результате транскрипции генов циклина E, удалением/секвестрацией p27^{KIP1} и p21^{CIP1}, опосредованной комплексами циклин D-CDK4 и циклин D-CDK6, а также с помощью протеолиза, опосредованного убиквитином. Кроме того, активность CDK2 ингибируется фосфорилированием, индуцированным воздействием WEE1, в Tyr-15, в свою очередь, это ингибирующее фосфорилирование устраняется фосфатазами семейства CDC25, таким как CDC25A и CDC25B [326]. Комплексы циклин E-CDK2 фосфорилируют различные белки, необходимые для прогрессирования клеточного цикла, репликации ДНК и дупликации centrosомы [66, 225]. Во время фазы S циклин E быстро деградирует в результате убиквитинирования, опосредованного FBXW7 [295, 368], и CDK2 связывается с вновь синтезированным циклином A2, образуя активные комплексы циклин A-CDK2 [328, 368]

Мутации CDK2 относительно редко встречаются при онкологических заболеваниях человека, однако, изменение каталитической активности комплексов, содержащих CDK2, обнаруживаются с достаточно высокой частотой, так амплификация локуса *CCNE1* часто выявляется, например, при раке яичников и молочной железы (рисунок 6б) [66, 274, 368]. Гиперактивация локусов CDK2 обусловлена несколькими механизмами: в некоторых типах опухолей сверхэкспрессия циклина E происходит в результате мутаций, обуславливающих потерю функциональной активности в гене, кодирующем FBW7 (*FBWX7*), компонент убиквитинлигазы, участвующий в деградации циклина E [96, 375], также, некоторые опухоли экспрессируют гиперактивную, укороченную форму циклина E1 [41]. Аналогично, часто обнаруживается гиперэкспрессия циклина A, например, в результате геномной амплификации при гепатоцеллюлярной карциноме, колоректальном раке, раке молочной железы [180, 214, 233]. В некоторых опухолях активность CDK2 усиливается вследствие снижения

экспрессии ингибитора CDK p27^{Kip1}, например, из-за усиления деградации, опосредованной SKP2 [88].

Различные механизмы активации CDK2 экспериментально подтверждены с использованием моделей рака у мышей различных линий. Трансгенная гиперэкспрессия циклина E1 в молочных железах способствовала образованию рака молочной железы [368]. Повышенная активность циклина E-CDK2 в результате делеции генов, кодирующих белки-ингибиторы CDK p27^{KIP1} или p21^{CIP1}, также увеличила восприимчивость к образованию опухолей [213, 265]. Трансгенная сверхэкспрессия CDC25A или CDC25B усилила образование рака молочной железы, вызванное v-HRAS, ERBB2^{V664E} и различными канцерогенами [196]. Напротив, гетерозиготная делеция *Cdc25a* ингибировала образование опухолей молочной железы, вызванное v-HRAS и ERBB2^{V664E} [187, 412].

Таким образом, невозможно однозначно ответить на вопрос, требуется ли активность CDK2 для возникновения и поддержания роста опухоли. Некоторые линии человеческих опухолевых клеток сохраняют пролиферативную активность, несмотря на ингибирование CDK2, аналогичным образом, мыши, лишённые CDK2, демонстрируют ненарушенный опухолегенез в некоторых тканях [189, 190]. Однако было показано, что опухоли с гиперэкспрессией MYC требуют фосфорилирования MYC, опосредованного CDK2, для подавления механизмов старения [76, 413]. Нокаунт гена *Cdk2* ингибировал образование опухоли в мышинной модели В-клеточной лимфомы со сверхэкспрессией MYC (*Em-Myc*) [413, 418]. Более того, истощение CDK2 подавляло прогрессирование клеточного цикла в клетках меланомы [331]. Кроме того, мышинные модели онкологических заболеваний показали, что CDK2 критически необходима для образования рака молочной железы, вызванного сверхэкспрессией *ErbB2*^{V664E} или ассоциированной с раком укороченной изоформы циклина E1. Следовательно, функциональная активность CDK2 может являться необходимой при определенных типах злокачественных новообразований [331, 413].

CDK1. Во время фазы G2 CDK1 связывается и активируется циклинами A2 и B. После вступления в митоз циклин A2 деградирует, а активность CDK1

поддерживается в комплексах с циклинами В-типа; активность киназы CDK1 необходима для вступления в митотический процесс и ряда важных митотических событий. Циклины В-типа деградируют под действием комплекса, стимулирующего анафазу (APC^{CDC20} и APC^{CDH1}), в позднем митозе [296]. Это ослабляет активность CDK1 и позволяет разделять хромосомы и завершать митоз и цитокинез. В дополнение к регуляции со стороны партнеров-циклинов, активность CDK1 ингибируется фосфорилированием в Thr-14 и Tyr-15, опосредованным киназами MYT1 [248, 277] и WEE1 [166], соответственно; это фосфорилирование обеспечивается фосфатазами CDC25.

Интересно, что активность CDK1 обычно не нарушается при онкологических заболеваниях; одним из немногих примеров является амплификация гена *CCNB3* при нейроэндокринном раке простаты [79]. Трансгенная сверхэкспрессия циклинов В1 или В2 увеличивает восприимчивость к опухолям кожи и легких, вызванным канцерогенами, что свидетельствует о потенциальной роли повышенной активности CDK1 в онкогенезе [61]. Было показано, что CDK1 необходима для образования и прогрессирования опухолей. Например, специфическая для гепатокарцином, абляция *Cdk1* обеспечивает невосприимчивость к опухолеобразованию в печени, вызванному мутацией $NRAS^{G12V}$, в то время как ингибирование CDK1 блокирует рост ксенотрансплантатов колоректального рака с мутацией *KRAS* (G12V, G12D или G12S) [323, 398]. Однако активность CDK1 необходима для пролиферации также в нормальных, нетрансформированных клетках [61], что говорит против терапевтической стратегии, направленной на ингибирование CDK1. Интересно, что ингибирование CDK1 индуцирует апоптоз клеток лимфом и опухолей печени мышей с повышенной экспрессией MYC [183], а также базальноподобных клеток человеческого трижды негативного рака молочной железы [279]. Эти результаты показывают, что ингибирование CDK1 может оказывать специфическое воздействие на опухолевые клетки, вызывая при этом лишь временную остановку клеточного цикла в нормальных тканях, но требует дальнейшего изучения с использованием различных генетических моделей.

CDK4/6. В экспериментальных исследованиях было установлено, что многие виды онкологических новообразований имеют дефекты в системе ингибирования CDK4/6, геномные или транскрипционные aberrации, приводящие к активации CDK4/6, вызывают изменения в механизме клеточного цикла, которые способствуют неконтролируемому клеточному делению. Так, например, амплификация CDK4 выявляется при липосаркоме и глиобластоме, а CDK6 — при раке верхних отделов желудочно-кишечного тракта и нейроэндокринной карциноме предстательной железы [334]. Специфические транслокации и мутации, приводящие к повышению уровня циклина D, наблюдаются, например, в мантийноклеточной лимфоме. Снижение или утрата активности, вызванное различными генетическими нарушениями p16INK4A обнаруживается в большом количестве опухолей различных локализаций: карцинома головы и шеи, мочевого пузыря, поджелудочной железы и легких, глиобластомы, а также злокачественные опухоли оболочек периферических нервов [140, 334]. Потеря функциональной активности p16INK4A приводит не только к снижению ингибирования CDK4/6, а также и к повышению активности CDK2, что является дополнительным стимулом к процессам клеточного деления [65].

Комплексы циклина D-CDK4/6 также являются ключевым связующим звеном различных митогенных и антимитогенных сигналов. Например, при многих онкологических заболеваниях отмечается повышенный уровень циклина D, что за счет «обратной связи» приводит к активации пути RAS/RAF/MEK/ERK, в том числе за счет сверхэкспрессии рецепторов фактора роста или индуцирования мутаций в сигнальных эффекторных белках [36, 143], в результате чего происходит закольцовывание патологического пролиферативного импульса. Гиперактивация сигнального пути фосфоинозитид-3-киназа/протеинкиназа В (PI3K/Akt) приводит к увеличению трансляции циклина D1 и снижению его внутриядерного экспорта, что может резко повышать его функциональную активность и способствует усилению пролиферации клетки [334]. В экспериментальных исследованиях было показано, что нокаут гена CCND1,

кодирующий белок циклина D1, у мышей приводил к отсутствию роста опухолей молочных желез, индуцируемых ErbB2 или RAS мутациями [221]. Важность данных молекулярных мишеней и большое количество исследований, посвященных белкам контроля пролиферации, в том числе, циклину D1, CDK4/6 и их ингибиторам, позволили создать ряд перспективных препаратов, в том числе селективные ингибиторы CDK4/6: палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб.

1.4 Лекарственные препараты, направлено/таргетно воздействующие на ключевые мишени клеточного цикла (современное состояние проблемы)

Несмотря на то, что основные регуляторы клеточного цикла были открыты более 30 лет назад, значимый прорыв в понимании их роли при развитии онкологии, потенциала в качестве мишеней для противоопухолевой терапии и создание на их основе новых препаратов произошел за последнее десятилетие. Разработка новых соединений с использованием структурно-ориентированного дизайна лекарственных препаратов и эффективных высокопроизводительных платформ скрининга осуществила за достаточно короткий временной период переход от лабораторных разработок к клиническому использованию [301]. Протеинкиназы стали основными целями терапевтических разработок, большая часть из которых относится к разработке противоопухолевых препаратов. В настоящее время FDA одобрило 69 терапевтических средств, которые нацелены примерно на 24 протеинкиназы, для лечения опухолевых заболеваний [288]. Первым препаратом, одобренным FDA, являлся селективный ингибитор CDK4/CDK6 – палбоциклиб, направленный на лечение рака молочных желез и его успешный клинический опыт показал перспективность и важность разработок в этом направлении [77, 138].

Значимым стимулом в разработках новых лекарственных препаратов явилось создание открытых баз данных по молекулярным структурам протеинов, белков, генетическим последовательностям. Доступность рентгеновских кристаллических структур протеинкиназ в открытом доступе существенно ускорила процесс разработки лекарственных препаратов на основе структурной

информации [288, 185]. Кристаллическая структура с PDB id 6GUB в последнее время использовалась во многих работах в качестве комплексного кристаллического комплекса CDK2/CyclinA (Рисунок 8а) [226, 409].

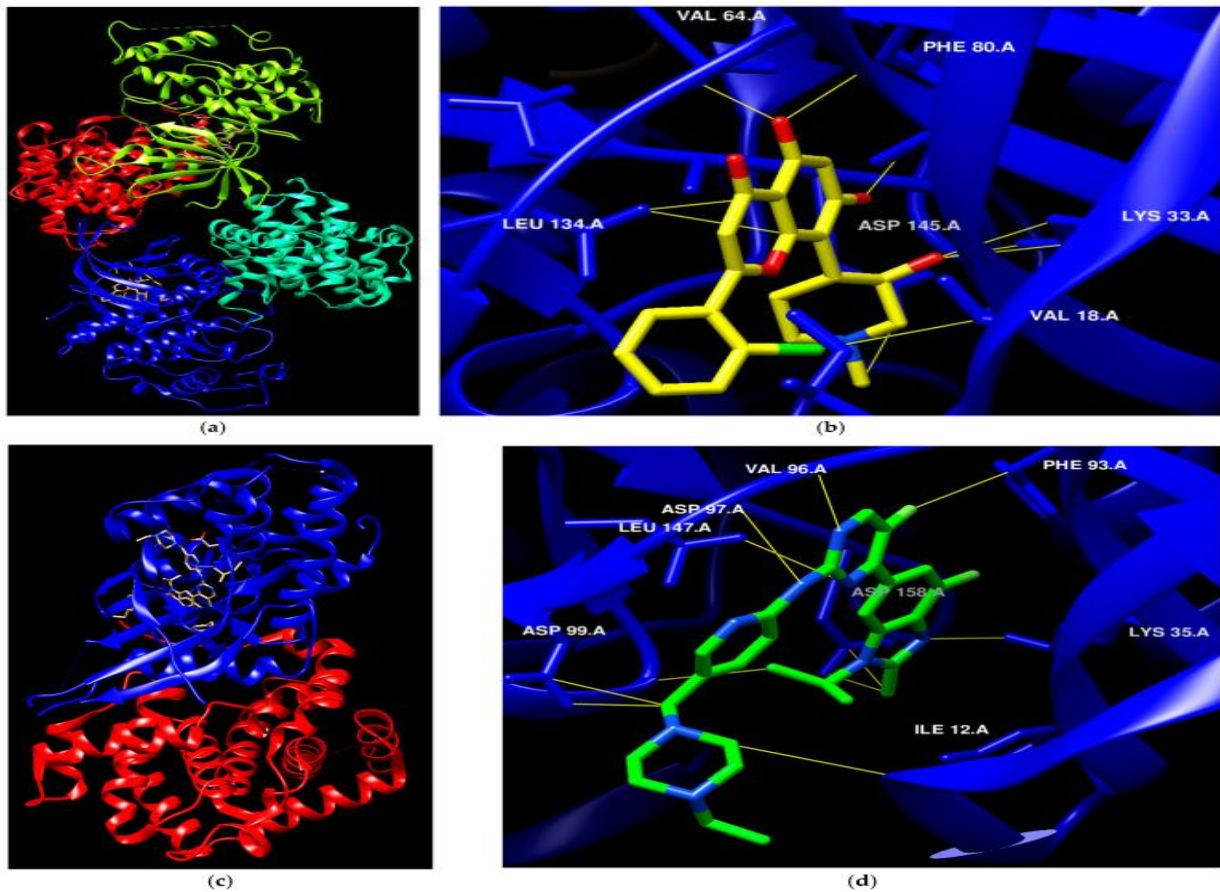


Рисунок 8 – Пример разработки лекарственных препаратов на основе их кристаллической структуры

Примечание - а. Кристаллическая структура CDK2/CyclinA с флавопиридолом (PDB: 6GUB); б. Взаимодействия между флавопиридолом и аминокислотными структурами в сайте связывания CDK2; с. Кристаллическая структура CDK4/CyclinD с абемациклибом (PDB: 7SJ3); д. Взаимодействия между абемациклибом и аминокислотными структурами в сайте связывания CDK4 [226]

Флавопиридол считается ингибитором ряда циклин-зависимых киназ, он способен вызывать остановку клеточного цикла и индуцировать апоптоз [369, 379]. Экспериментально было доказано, что этот агент препятствует активности CDK2 за счет со-кристаллизации с CDK2, как показано на рисунке 8а [209], способ связывания этого препарата был выяснен путем установления гидрофильных и гидрофобных взаимодействий с остатками Lys33, Val18, Phe80,

Val64 и Leu134 (Рисинок 8b) [335]. Кристаллическая структура, получившая идентификационный номер/код PDB 7SJ3, была использована в нескольких исследованиях в качестве трехмерной кристаллической модели комплекса CDK4/Cyclin D. В исследованиях оценивалось пространственное взаимодействие данного комплекса с абемациклибом (одобрен FDA в 2017 году для лечения рака молочной железы) (Рисунок 8с) [147, 226]. Сайт связывания и способ взаимодействия абемациклиба был выяснен путем установления гидрофильных и гидрофобных взаимодействий с остатками Ile12, Lys35, Phe93, Val96, Asp97, Leu147 и Asp99 (Рисунок 8d) [46, 80, 226].

В настоящее время в базы данных внесено большое количество запатентованных структур белков и функциональных молекул, которые широко используются в процессе разработки лекарственных соединений, около 180 ингибиторов протеинкиназ находятся на стадии клинических исследований [87, 105].

1.4.1 Ингибиторы белков семейства RAS

Мутации генов семейства RAS (KRAS, HRAS, NRAS) обнаруживаются в 30–90% случаев аденокарцином желудочно-кишечного тракта, включая колоректальный рак (40–50%), рак поджелудочной железы (90%) и НМРЛ (30%) [380]. Онкогенные варианты стабилизируют Ras-белки в GTP-связанном состоянии, блокируя гидролиз GTP до GDP. Это приводит к гиперстимуляции сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K/AKT, что усиливает пролиферацию, ангиогенез и метастатический потенциал опухолей [373].

Согласно последним данным литературы в настоящее время только два ингибитора Ras-ГТФазы получили одобрение регулирующих органов для клинического использования: соторасиб и адаграсиб. Оба ингибитора специально нацелены на мутацию KRAS G12C, что представляет собой важное достижение в прецизионной онкологии. Соторасиб (AMG-510) является первым одобренным FDA ковалентным ингибитором, нацеленным на KRAS(G12C)-положительный немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) [236]. Ускоренное одобрение FDA было

получено в мае 2021 года на основе испытания CodeBreak 100 [250], а в июле 2023 г. противоопухолевый лекарственный препарат соторасиб под коммерческим названием Лумикрас® был зарегистрирован в России (регистрационное удостоверение ЛП-№002763-(РГ-RU) от 14.07.2023). Данный препарат продемонстрировал объективный уровень ответа 37,1% со средней продолжительностью жизни без прогрессирования 6,8 месяцев [250]. Адаграсиб (MRTX849/Krazati) является вторым ингибитором KRAS G12C [236, 287], первоначально одобренным FDA для лечения местно распространенного или метастатического немелкоклеточного рака легких с мутацией KRAS G12C в 2022 году [38]. С тех пор Адаграсиб приобрел дополнительную значимость, получив ускоренное одобрение FDA для использования в сочетании с цетуксимабом для пациентов с местно-распространенным или метастатическим колоректальным раком (КРР) с мутацией KRAS G12C, что сделало его первым ингибитором KRAS, одобренным в Соединенных Штатах для лечения колоректального рака [38]. Однако на фоне воодушевляющих результатов клинической эффективности оба препарата имеют существенные недостатки. Соторасиб вызывает гепатотоксичность, включая повышение печёночных ферментов (АЛТ/АСТ), с тяжёлыми случаями у 3% пациентов и тяжёлыми повышениями (степень 3/4) у 6%, что иногда требует прекращения терапии (медиана начала — 9 недель). Также наблюдались частые побочные эффекты, включающие желудочно-кишечные расстройства (диарея (42%), тошнота (26%)), усталость (26%); тяжёлые осложнения (у 50% пациентов): пневмония (8%), гепатотоксичность (3%); отмечались также летальные исходы (3%) и случаи интерстициального поражения лёгких/пневмонита (0,8%). Кроме того, наблюдения за пациентами после завершения клинических исследований выявили риски гепатобилиарных нарушений [106].

Адаграсиб также вызывает гепатотоксичность (хотя реже), но с более выраженными желудочно-кишечными симптомами: диареей (63%), тошнотой (62%) и рвотой (47%), требуя более частой коррекции дозы [156, 228]. Особые риски включают удлинение интервала QT, повышающее риск аритмий при

совместном применении с другими препаратами, удлиняющими QT, а также частые коррекции дозы (у 52% пациентов) и временные приостановки терапии (у 61%) [175].

Таким образом, оба препарата имеют значительные токсические эффекты (гепатотоксичность, желудочно-кишечные расстройства), но адаграсиб отличается более частыми коррекциями дозы и кардиальными рисками [175]. Несмотря на значительную исследовательскую деятельность в этой области, все другие ингибиторы Ras-GTPase остаются на стадии разработки. Ещё несколько соединений, включая LY3537982, JDQ443 и диварасиб, которые также направлены на мутации KRAS G12C, проходят клинические испытания [250].

1.4.2 Ингибиторы CDK4/6

За последнее десятилетие FDA одобрило четыре ингибитора CDK4/6 (Таблица 1), являющихся ингибиторами протеин-серин/треонин киназ [285, 419].

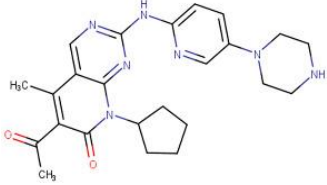
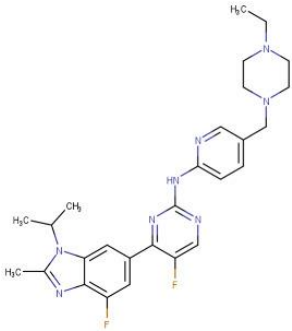
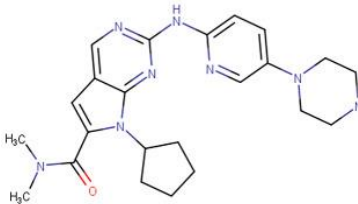
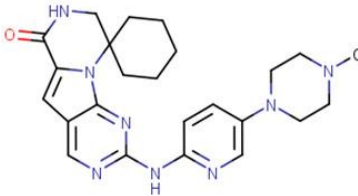
Данные препараты имеют схожую структуру молекулярного ядра, характеризующуюся каркасом из остатков пиперазин-пиридин-пиримидин-амин. За счет схожей молекулярной структуры, данные соединения проявляют сходные свойства, в том числе конформационное связывание с неактивной киназой. Кроме того, они устанавливают водородные связи между 3N-пиридиновым фрагментом и NH-группой His100, а также между карбонильной (CO) группой Val101 и экзоциклической NH-группой боковой цепи [285, 408].

Полученный в 2001 году, палбоциклиб стал первым CDK4/6-специфичным ингибитором, продемонстрировавшим активность против различных линий раковых клеток человека и ксенотрансплантатов, включая опухоли молочной железы [146]. Ингибирование CDK4/6 было наиболее эффективным в отношении гормонально-положительных (HR+) карцином молочной железы люминального типа, в результате чего, первое клиническое применение ингибиторов CDK4/6 (палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб) было проведено в отношении рака молочной железы [146, 388]. Клинические исследования II и III фазы, включающие палбоциклиб (PALOMA), рибоциклиб (MONALEESA) и

абемациклиб (MONARCH), проводились с 2015 года [217, 251, 271]. У пациентов с прогрессирующими опухолями молочной железы HR+/HER2 – изучалась эффективность комбинации CDK4/6i со стандартной терапией (ингибитором ароматазы, летрозолом, или антагонистом рецепторов эстрогена, фулвестрантом). Включение любого из этих CDK4/6i значительно увеличивало выживаемость пациентов и выживаемость без прогрессирования [57, 217]. Кроме того, после назначения в качестве монотерапии абемациклиб увеличивал показатель выживаемости без прогрессирования у женщин с метастатическим раком молочной железы HR+/HER2– [47, 136]. В результате, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) разрешило использование всех трех препаратов CDK4/6i в лечении пациентов с прогрессирующим или метастатическим раком молочной железы HR+/HER2– [285].

Палбоциклиб и рибоциклиб являются, соответственно, высокоселективными ингибиторами CDK4 и CDK6 [328, 400, 414], в то время как абемациклиб обладает способностью воздействовать и на другие киназы. Для палбоциклиба и рибоциклиба ограничивающими типами токсичности, зафиксированными при клиническом применении, являются нейтропения, тромбоцитопения и анемия. Поскольку физиологически в гемопоэтических клетках достаточно высокая активность комплексов циклин D3-CDK6, данные препараты подавляют эту активность, что приводит к возникновению побочных гематотоксических эффектов [212, 213, 283]. И наоборот, побочные гематологические реакции, как правило, менее выражены у пациентов, получавших абемациклиб, вследствие направленности его воздействия в большей степени на CDK4, а не на CDK6 [138]. Отсутствие серьезных побочных реакций со стороны кроветворной системы позволяет не проводить вынужденные остановки приема абемациклиба. В то же время при применении данного препарата отмечаются выраженные реакции со стороны желудочно-кишечного тракта [77, 155].

Таблица 1 – Структура одобренных FDA ингибиторов CDK4/6, год одобрения и показания к применению

Наименование препарата	Химическая структура	Год	Показания к применению
Палбоциклиб		2015	Комбинированная терапия рака молочной железы [354]
Абемациклиб		2017	Рак молочной железы [292]
Рибоциклиб		2017	Комбинированная терапия рака молочной железы [45]
Трилациклиб		2021	Миелопротекторное средство [393]

На сегодняшний день, основной гипотезой возникновения данных побочных эффектов является воздействие абемациклиба на CDK9. Так, скрининг молекулярных мишеней абемациклиба показал, что помимо CDK4/6 абемациклиб активно связывается с CDK9 и ингибирует ее функциональную активность, что приводит к снижению уровня белка p-Ser2 в карбоксильном концевом домене (CTD) РНК-полимеразы II (Pol II), Мус, Vcl-2 и миелоидной клеточной лейкемии-1 (Mcl-1), что важно для противоопухолевого эффекта. Это открывает возможности использования данного препарата при нозологиях, в которых данный путь инициации транскрипции является превалирующим, например при остром миелолейкозе [155, 294].

Результаты большого количества клинических исследований показали, что побочные эффекты при приеме ингибиторов CDK 4/6 предсказуемы и быстро обратимы после прерывания терапии или изменения/редукции дозы препаратов [12, 294]. По мнению большинства экспертов, тщательное наблюдение за пациентом на фоне терапии ингибиторами CDK 4/6 позволяет своевременно провести коррекцию лечения и тем самым снизить риск тяжелых осложнений [12].

Полученные результаты применения данных препаратов показали, что их включение в программы терапии существенно увеличивает медиану времени до прогрессирования, а для рибоциклиба и абемациклиба зарегистрировано достоверное увеличение продолжительности жизни [83, 93]. Однако, несмотря на достигнутые успехи, многими врачами и исследователями подчеркивается, что требуются новые дополнительные исследования по определению биомаркеров, которые будут способствовать персонализации назначений ингибиторов CDK4/6 в различных популяциях пациентов. Тем самым мы избежим побочных эффектов и увеличим эффективность препаратов данного типа [338].

Одной из существенных проблем в применении ингибиторов CDK4/6 является развитие резистентности. В связи с чем, поиск молекулярных маркеров чувствительности к данным препаратам и риск развития резистентности являются одними из наиболее острых проблем в терапии CDK4/6i. Так при ингибировании CDK4/6 в опухолевых клетках возникают или активизируются пути пролиферации, в которых не задействован RB1, ингибированный приемом CDK4/6i. Данный эффект приводит к тому, что хотя в клетках более не экспрессируется CDK4/6, происходит активация процессов клеточного деления, которая уже не может быть остановлена приёмом ингибиторов CDK4/6 [294].

Состояние функциональной активности RB1 в опухолевых клетках является важным предиктором эффективности CDK4/6i и оценка его как маркера ответа на планируемую терапию, возможно, позволит оптимизировать назначение препаратов данного типа [93]. Влияние же других, казалось бы, очевидных факторов, остается не ясным. Так, отмечено, что раковые опухоли с геномной

активацией генов CCND1-3 особенно уязвимы к CDK4/6i [207]. Апостериорные результаты исследований PALOMA показали, что эффективность реакций на CDK4/6i не была связана ни с амплификацией CCND1, ни с уровнями мРНК циклина D1 [125]. Выявлена связь клинической эффективности с уровнем амплификации гена CDK4. При наличии гиперэкспрессии белка отмечена большая чувствительность к CDK4/6i, что, однако, не исключает риск развития резистентности [146]. В ряде исследований продемонстрировано, что чувствительность к лечению палбоциклибом при раке молочной железы может быть предсказана путем иммуногистохимической идентификации Thr172-фосфорилированного CDK4 (активирующее фосфорилирование, осуществляемое через CDK-активирующую киназу, САК). Это открытие важно еще и тем, что позволяет внедрить иммуногистохимический маркер как прогностический показатель, который может быть достаточно просто оценен в опухолевых тканях. Еще одним возможным маркером оценки эффективности применения CDK4/6i может являться уровень мРНК циклина E1 при метастатических поражениях, который коррелирует с резистентностью к палбоциклибу [73]. Однако, требуется гораздо больше исследований по поиску и внедрению маркеров, чтобы точно предсказать, как пациенты будут реагировать на ингибирование CDK4/6.

Помимо остановки клеточного цикла, появляется все больше доказательств того, что CDK4/6i играют парадоксальную роль в лечении рака, изменяя иммунную систему. Действительно, клинические данные показали, что CDK4/6is могут оказывать воздействие на ряд показателей иммунной системы, в частности, на функциональную активность Т-лимфоцитов, что с одной стороны может способствовать активизации собственного противоопухолевого иммунитета, но с другой, способствует развитию резистентности опухоли к CDK4/6i [73, 223, 414]. Хотя молекулярный механизм воздействия CDK4/6is на иммунную систему до конца неясен, в настоящее время предложен ряд стратегий, в частности сочетание CDK4/6is с иммунотерапией, для преодоления развития лекарственной устойчивости опухоли к введению CDK4/6is [223].

Ингибиторы CDK4/6 представляют собой перспективный вариант терапии различных видов онкологических заболеваний, например, опухолей желудочно-кишечного тракта [399] и рака мочевого пузыря [155] благодаря высокой частоте молекулярных изменений комплексов циклин-CDK4/6 при опухолях данных локализаций. Отмечается, что воздействие на поврежденные молекулярные мишени пролиферации клеток потенциально может замедлить или остановить рост опухолей [155, 399].

Эффективность ингибиторов CDK4/6 в отношении рака пищевода и гортани была продемонстрирована в доклинических исследованиях, где они показали значительный противоопухолевый эффект, вызывая остановку клеточного цикла, особенно в фазе G1. Остановка процессов клеточного деления позволяет элиминировать опухолевые клетки, что, несомненно, будет способствовать клинической эффективности [399].

Однако, несмотря на впечатляющие результаты доклинических исследований, эффективность применения ингибиторов CDK4/6 в качестве самостоятельного метода лечения имеет ряд ограничений. Например, при раке пищевода не было получено статистически значимых объективных ответов на фоне проводимой терапии, что указывает на то, что эти препараты могут быть неэффективны при самостоятельном применении [345, 399]. В то же время, при сочетанном их использовании, ингибиторы CDK4/6 могут стать прорывной терапией для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта, однако для оптимизации их применения и улучшения результатов лечения пациентов необходимы дальнейшие исследования, включая подбор схем терапии [399].

Опухоли ЦНС, асторцитомы и глиобластомы в большом числе случаев имеют нарушения в системе циклин-зависимых киназ и их ингибиторов [342]. Однако, используемые в клинической практике CDK4/6i имеют низкую проницаемость через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [342, 343]. Активно ведутся исследования по возможности использования ингибиторов CDK4/6 в нейроонкологии, результаты экспериментальных исследований позволили разработать ряд молекул, способных воздействовать на опухолевые клетки глиом

и обладающих способностью к проникновению через ГЭБ. Подчеркивается важность определения биомаркеров эффективности терапии для прогнозирования исходов лечения, а также проведения дополнительных исследований, которые позволят добиться более высоких результатов [177, 266, 343].

Безусловно, основные регуляторы клеточного цикла были открыты более 30 лет назад, но именно за последнее десятилетие было существенно расширено представление об их роли в канцерогенезе и потенциале в качестве мишеней для таргетной терапии [10, 26, 33]. Разработка новых соединений с использованием структурно-ориентированного дизайна лекарств и эффективных высокопроизводительных платформ скрининга позволила перенести исследования клеточного цикла с лабораторного стола на стационарное лечение [21, 29, 405]. Действительно, одобрение селективных ингибиторов CDK4/CDK6 для лечения рака груди FDA является клиническим прорывом в этой области [146, 285]. Также могут быть разработаны ингибиторы, которые селективно ингибируют определенные типы CDK, не воздействуя на другие, что возможно, сможет снизить побочные эффекты без ущерба для терапевтической пользы. Кроме того, вероятно, будут разработаны и внедрены селективные ингибиторы CDK2 и CDK1, поскольку они могут иметь клиническую пользу для определенных нозологий [47].

Необходимо отметить, что успех будущих методов лечения, нацеленных на молекулярные мишени контроля клеточной пролиферации, будет зависеть как от разработки селективных и мощных соединений, так и от выявления специфической чувствительности опухолевых клеток [317, 364]. Методы скрининга на основе клеточных культур, ксенотрансплантатные модели, полученные от пациентов, и генетически модифицированные мышинные модели опухолевых заболеваний являются наиболее важными методами в исследованиях взаимодействий между геномными поражениями и селективным ингибированием отдельных белков клеточного цикла. Новые методы лечения, способные воздействовать на несколько компонентов одного и того же пути, такие как микроРНК, также могут обеспечить терапевтические преимущества.

Действительно, MRX34, имитатор miR-34, нацеленный на несколько генных транскриптов клеточного цикла, недавно был допущен к первой фазе клинических исследований [309, 329]. Более того, сочетание нескольких селективных ингибиторов может существенно улучшить клиническую активность; но в нескольких случаях комбинированные методы лечения показали значительное увеличение побочных эффектов и, таким образом, могут не переноситься многими пациентами. Кроме того, текущие методы таргетной терапии страдают от относительно низкого процента пациентов, показывающих удовлетворительный долгосрочный ответ [39, 317, 329, 364].

Несомненно, геномные технологии станут бесценным диагностическим инструментом для определения предиктивных биомаркеров восприимчивости пациентов к терапии ингибиторами CDK. Поскольку многие доклинические исследования, а также клинический опыт указывают на возникновение резистентности (рецидива после первоначального ответа), исследование механизмов резистентности поможет определить варианты лечения для рецидивирующих/рефрактерных пациентов или предложить комбинированную терапию, которая предотвратит формирование резистентности.

1.5 Метод внутриклеточной доставки, основанный на использовании технологии интернализуемых пептидов (cell penetrating peptides (CPPs))

Эффективная внутриклеточная доставка (или адресная доставка) в целевые внутриклеточные компартменты является одной из основных проблем при создании новых лекарственных средств. В большинстве случаев для проявления биологического эффекта и создания необходимой/действующей внутриклеточной концентрации требуется введение в организм большого количества препарата, что сопровождается побочными эффектами и токсическим влиянием на окружающие здоровые ткани. Поэтому поиск новых средств доставки лекарственных препаратов - это актуальная задача современной медицины [72, 84].

Одним из современных и перспективных направлений в этой области является разработка пептидных последовательностей, обладающие векторными

свойствами и получившие название cell penetrating peptides (CPPs). Данные пептиды могут являться эффективным транспортным средством для внутриклеточной доставки большого количества разнообразных веществ, начиная от наночастиц\пептидов до полноразмерных белков. Метод доставки, основанный на CPPs, считается единственным методом, не нарушающим целостность плазматической мембраны и при этом обладающим такими важными свойствами, как эффективная доставка *in vivo*, внутриядерный транспорт, возможность применения ко всем типам клеток. Также важным свойством является низкая иммуногенность CPPs и способность внутриядерного транспорта макромолекул. Эти свойства CPP используются для внутриклеточного транспорта как пептидов и белков, так и других молекул, включая ДНК и РНК [7, 52, 387].

Соединение возможности целевой доставки пептидов в клетку и обнаружение коротких функциональных доменов в белках регуляторах различных клеточных функций создали предпосылки для конструирования молекул, имеющих патогенетическую направленность [91, 358, 363]. Относительная простота синтеза таких молекул позволяет говорить о принципиальной возможности создания индивидуальных химиопрепаратов на их основе, т.е. влияющих на патологические изменения, свойственные данной конкретной опухоли [256, 284, 320].

Интернализуемые пептиды (CPPs) представляют собой короткие пептидные последовательности, менее чем 30 аминокислот, которые способны проникать через мембраны клеток и переносить в клетки различные соединения [72]. Кажется, что единственной общей особенностью этих пептидов, является их положительный заряд и высокое содержание основных аминокислот [103, 387]. Одним из общих свойств можно назвать почти обязательное присутствие нескольких молекул аргинина [43, 84, 181]. Обнаружение такой закономерности позволило ряду исследователей говорить о свойствах интернализации – как свойства пептидов богатых аргинином [181, 269]. Однако позднее были синтезированы последовательности, не содержащие аргинина и имеющие свойства внутриклеточного транспорта [178, 269].

Большинство CPPs инертно и их проникновение не имеет побочных эффектов [178, 365]. В настоящее время, установлено, что они проникают в большинство эукариотических клеток, проникновение происходит быстро (полупериод от 5 до 20 минут), и размер груза существенно не влияет на скорость проникновения [178, 255]. Основные свойства, объединяющие различные по структуре пептиды в этот класс, заключаются в следующем: быстрое проникновение в клетки (несколько минут); отсутствие избирательности по отношению к типу клеток – пептид накапливается в 100% клеток; проникновение не носит рецепторный характер; проникновение не зависит от температуры в пределах от 4 °С до 37 °С; низкая иммуногенность; не используется фагоцитозный или пиноцитозный путь.

Можно предположить, что аминокислотные последовательности, ответственные за интернализацию, были созданы природой с целью содействия транспорту определённых белков и пептидов [178]. В пользу этой теории говорит открытие антимикробных пептидов, таких как буфорин, которые, как оказалось, обладают способностью быстро проникать сквозь биологические мембраны [224, 349].

В настоящее время известно несколько групп интернализуемых пептидов, которые различаются по происхождению. Примеры аминокислотных последовательностей некоторых интернализуемых пептидов [256, 365]:

1. Пенетратин - Белок Antennapedia из *Drosophila melanogaster* – RQIKIWFQRRMKKWK;
2. Фрагмент Tat (47-57) - Транскрипционный фактор, участвующий в репликации вируса СПИДа – YGRKKRRQRRR;
3. Фрагмент Tat (48-60) - Транскрипционный фактор, участвующий в репликации вируса СПИДа – GRKKRRQRRRPPQ;
4. VP-22 - Вирус-протеин капсида простого герпеса 22 – DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE;
5. Kaposi FGF, или пептид, основанный на сигнальной последовательности II - Фактор роста фибробластов саркомы Капоси – AAVALLPAVLLALLAP;

6. HIV-1 gp-41 - Гидрофобный терминальный домен белка gp-41 вируса СПИДа – GALFLGFLGAAGSTMGA;

7. Транспортан - Галанин + Масторапан – GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL.

1.5.1 Свойства пептидов, необходимые для интернализации

Для того чтобы понять, что придаёт определённым CPPs способность к интернализации, в большом количестве исследований были проведены сравнения их физико-химических характеристик. По физико-химическим свойствам пептиды можно разделить на две группы – гидрофобные и амфифильные [208, 227]. Длина пептидов колеблется от 11 до 30 аминокислот. Единственным найденным на сегодняшний день свойством, объединяющим все CPPs, является высокое содержание основных аминокислот, наличие которых придаёт CPPs положительный заряд [246]. Например, циклоспорин А, эффективно проникает в Т-лимфоциты кожи, подавляет воспаление, связываясь с гепто-аргининовым сегментом, тем самым подтверждается важное свойство положительного заряда для интернализации [129, 246]. Однако было установлено, что наличие положительного заряда не является достаточным условием для протекания явления интернализации. Было показано, что октамер аргинина (Arg)₈ проникает в клетки, в то время как (Arg)₁₆ не обладает данным свойством [129].

Также была исследована важность типа вторичной структуры [208]. Предположительно, для большого количества CPPs характерна α -спираль. Однако, например, для пенетратина было установлено, что характерная для него α -спиральная вторичная структура может переходить в β -складчатую структуру в присутствии заряженного липидного монослоя [270]. Более того, амфифильный пептид, имеющий β -складчатую структуру, способен к интернализации [142, 270].

1.5.2 Возможные модели интернализации (проникновения) CPPs

Учёные различных лабораторий, работающие по данной тематике, до сих пор обсуждают, что лежит в основе процесса интернализации этих специфических пептидов через биологические мембраны [227, 290]. Во многих

работах было показано, что эндоцитоз не участвует в процессе транспорта [246, 311], но некоторые авторы утверждают обратное. Например, Koppelhus с соавт. в своей работе показал, что проникновение пептида Tat носит в основном эндоцитозный характер [204]. При этом некоторые авторы расценивают явление наблюдаемой интернализации с помощью эндоцитоза как артефакт [72, 103].

На проникновение CPPs не влияют ингибиторы эндоцитоза, тем самым подтверждая неэндоцитозное течение процесса [103, 115, 256]. Также не наблюдается влияние на процесс температуры в диапазоне от 4° С до 37° С, что указывает на наличие энергонезависимого процесса [204]. Замена АКП CPP на её D-энантиомер не оказывает влияние на степень интернализации. Данное явление исключает рецептор-зависимое проникновение [115].

Подробно возможные модели проникновения CPPs представлены в работах Ruseska, I., Zimmer, A. 2020 [307], Dougherty, P. G. с соавт., 2019 [112]. В частности, Dougherty P. G в контексте циклических пептидов описывает 4 механизма проникновения: пассивная диффузия, активный транспорт, эндоцитоз и прямое проникновение [112].

В качестве основных моделей проникновения рассматривают эндоцитоз и прямое проникновение. Эндоцитоз — это активный энергозависимый процесс, включающий этапы эндоцитарного захвата и высвобождения из эндосом [311]. Эндоцитоз подразделяется на фагоцитоз крупных частиц специализированными клетками (макрофаги, моноциты и нейтрофилы) и пиноцитоз для захвата растворенных веществ всеми видами клеток. Для пиноцитоза предложены 4 различных механизма: макропиноцитоз, клатрин-опосредованный эндоцитоз (КОЭ), кавеоло-опосредованный эндоцитоз (КвОЭ) и кларитин- и кавеоло-независимый эндоцитоз [62, 168, 256].

Макропиноцитоз считается главным путем проникновения CPPs в клетки и включает ремоделирование цитоскелета клетки, формирование актин-зависимого выступа мембраны и образование большого пузырька (до 1 мкм в диаметре) — макропиносомы [144, 275]. При физиологических условиях макропиноцитоз

активируется стимулирующими ростовыми факторами [218]. Он характерен для аргинин-богатых CPPs, таких как ТАТ и окта-аргинин [144, 217].

Высказано предположение, что протеогликаны мембран выступают в качестве своеобразных рецепторов, запускающих механизм захвата CPPs: гепарансульфат протеогликаны и синдеканы для R8, скавенджер-рецептор для NickFect51, аналога транспортана 10 [48, 152, 263, 264].

Клатрин-опосредованный эндоцитоз – рецептор-зависимый процесс, обеспечивающий захват питательных веществ, таких как холестерол и трансферрин [115, 381], поступление в клетку трансмембранных рецепторов и транспортеров, реконструкцию плазматических мембран в ответ на изменение внешней среды. Он подразумевает тесное взаимодействие лиганда со специфическим рецептором, инвагинацию мембраны в сторону цитоплазмы и формирование сферической структуры диаметром 100-150 нм [107, 168, 247]. Такой механизм проникновения предположительно используют следующие пептиды: ТАТ, R8, MPG и даже некоторые анионные ИП [192].

Кавеоло-опосредованный эндоцитоз сопровождается появлением кавеолосомы - колбовидной инвагинации мембраны в форме пещеры, диаметром 50-100 нм, нейтральным рН, гетерогенной морфологией и нечетко определенной судьбой. Этот механизм обеспечивает транспорт белков сыворотки через эндотелий, играет важную роль в сигнальных механизмах и регуляции липидного обмена, а также при канцерогенезе [49, 386]. Посредством рецепторов обеспечивается захват альбумина, фолиевой кислоты, щелочной фосфатазы, патогенов (токсин холеры, SV40 вирус, вирусы папилломы человека, HIV) [202]. Вирусы могут использовать этот путь, не подвергаясь лизосомальной деградации. Кавеоло-опосредованный эндоцитоз показан как один из путей внутренизации для ТАТ-пептида, пролин-богатых CPPs, транспортана/TP10, а также бактериального белка азурина и его фрагмента p28. Для ТАТ и транспортан-белковых комплексов такой тип проникновения более вероятен при увеличении размеров «соединений-грузов» [416]. Клатрин-каVELO-независимый эндоцитоз -

более быстрый процесс, связанный с функциональными участками мембраны в виде «липидных плотов» (rafts) – маленьких структур диаметром 40-50 нм, диффузно рассеянных по поверхности клеток. Этот процесс специфичен для липидов и жидкостей [386, 416]. Задействован при интернализации p28, транспортана и транспортана-10.

Прямое проникновение (транслокация, трансдукция) – энергонезависимый процесс, сопровождающийся дестабилизацией клеточной мембраны с формированием: 1) инвертированных мицелл; 2) пор; 3) или так называемой модели «ковра»-«carpet» [370]. Модель «ковра» описана как альтернативный эндоцитозу процесс, наблюдаемый при низких температурах и высоких концентрациях пептидов, кроме того, такой тип проникновения наиболее вероятен для первичных амфипатических CPPs [144, 307, 311].

Модель инвертированной мицеллы первоначально предложена для пенетрации. Взаимодействие CPP и липидного бислоя может вызвать конформационное повреждение пептида и изменение физических свойств мембраны [44, 299].

Модель порообразования предложена для амфипатических альфа-спиральных пептидов (Barrel-stave модель) и пептидов, способных принимать альфа-спиральную форму при контакте с клеточной мембраной (Toroidal модель) [95, 254, 313]. При этом варианте CPP накапливается на поверхности фосфолипидного слоя, вызывая деформацию мембраны и формирование временных пор [254, 313]. Предполагается, что проникновение опосредовано взаимодействием гуанидиновых групп и жирных кислот при наличии pH градиента плазматической мембраны [157, 188, 215]. Например, Pep1 быстро проникает в цитоплазму с минимальной деградацией, а возникающая при этом альфа-спиральная трансформация пептида подтверждена спектроскопией кругового дихроизма (CD), ЯМР-спектроскопией (NMR) и инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье (FTIR) [104]. Для пептида MPG проникновение в клетку связано с его способностью специфически

взаимодействовать с липидным бислоем и вызывать локальную дестабилизацию структуры мембраны, что облегчает трансмембранный перенос комплекса [131].

Для модели «ковра», предложенной для антимикробного амфипатического пептида дермасептина, характерно гидрофобное взаимодействие [275]. При этом высокая локальная концентрация пептида является ключевым фактором проникновения через мембрану [259]. Как альтернатива предложена модель «мембранного истончения» для маганина, обладающего широким спектром противомикробной активности [113, 298, 330].

Комплексная модель проникновения аргинин-богатых пептидов предложена Futaki S., Nakase I. [128], в данном случае при малых концентрациях CPPs взаимодействуют с протеогликанами, которые выступают в качестве рецепторов макропиноцитоза. При этом активация Ras - белка приводит к индукции актина и формированию макропиносом [131]. При больших концентрациях избыточное накопление пептида на мембране приводит к временной ее дестабилизации без образования стабильных пор (как при антимикробных пептидах) и, следовательно, без явного повреждения. Возможно, что прямое проникновение одного CPP или CPP с прикрепленным веществом небольших размеров (не более 10-20 кДа) возникает на фоне эндоцитарного насыщения [191]. Проникновение более крупных соединений возможно только путем эндоцитоза [131, 215]. Степень высвобождения CPP в цитозоль невелика из-за небольшой дестабилизационной способности аргинин-богатых пептидов, что объясняет и отсутствие значительных токсических эффектов [116]. Поэтому для разных CPPs и их соединений возможно имеют место различные механизмы проникновения в зависимости от свойств пептида, структуры клеточной мембраны, а также от экспериментальных условий [191].

Большое число факторов, влияющих на проникновение, а также отсутствие стандартизованных протоколов, приводит к тому, что каждое экспериментальное исследование уникально и трудно воспроизводимо. Результаты исследований сложно сравнивать, а выводы их часто противоречивы.

На сегодняшний день наиболее успешной/принятой теорией считается возможность использования различных механизмов в зависимости от структуры CPP (Рисунок 9) [256].

CPPs используют различные механизмы для прохождения через клеточные мембраны, включая прямую транслокацию, эндоцитоз и взаимодействие с рецепторами, экспрессирующимися на поверхности мембран [86, 286].

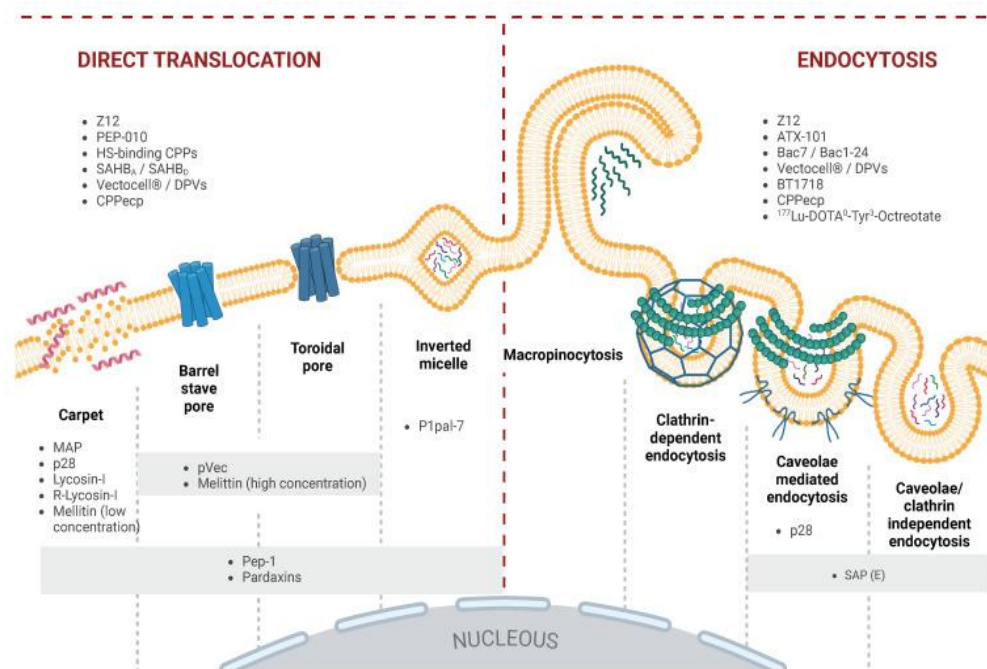


Рисунок 9 – Механизмы интернализации CPP через клеточные мембраны [256]

Таким образом, несмотря на ряд общих характеристик, CPPs демонстрируют различные пути интернализации, которые варьируются в зависимости от семейств пептидов и зависят от условий эксперимента. Такие факторы, как заряд, длина, структура и концентрация пептидов играют решающую роль в определении пути интернализации [256].

1.5.3 Использование CPPs как векторов внутриклеточной доставки

Метод доставки, основанный на использовании CPPs в качестве транспортных векторов, считается единственным методом, не нарушающим

плазматическую мембрану, и при этом обладающим такими важными свойствами, как: эффективная доставка *in vivo*, внутриядерный транспорт, возможность применения ко всем типам клеток, практически отсутствие ограничений в размере и природе переносимых молекул [115]. Также важным свойством является низкая иммуногенность CPPs [257]. Доставка посредством CPPs применяется не только по отношению к эукариотическим клеткам, также описан метод доставки агентов, таких как RNA, в бактериальные клетки [84, 363, 366].

В настоящее время, наиболее актуальным является возможность внутриядерного транспорта макромолекул с помощью CPPs [227, 257], так с его помощью изучаются новые возможности использования молекул – регуляторов клеточного цикла, индукторов апоптоза и других потенциальных противоопухолевых агентов. За последние несколько лет появилось большое количество работ, посвященных использованию CPPs для доставки различных веществ в клетки [142, 256, 257]. Экспериментально исследована возможность доставки внутрь клетки с помощью CPPs самых различных молекул [86, 273, 286, 396].

Использование свойств интернализации CPPs представляет особый интерес за счет возможности доставки с их помощью различных высокомолекулярных физиологически активных молекул, в частности пептидных цепей [286]. Это основано на данных, полученных при исследовании свойств таких важных белков – регуляторов клеточных функций, как p53, p16, p21, bcl-2, bax и др. [161, 356, 354, 378]. Эти белки относятся к группе продуктов генов, с нарушением функции которых часто связывают возникновение опухоли. Для большинства из них свойственны взаимодействия, приводящие к ингибированию или активированию соответствующих белков (генов) и функций, опосредуемых ими [354]. Одним из современных направлений в исследовании свойств этих белков стало выявление минимальной пептидной последовательности, способной выполнять ту или иную функцию полноразмерного белка [113]. Так, из белка - ингибитора пролиферации, приводящего к остановке клеточного деления на стадии G1 и отвечающего в клетке за процессы дифференцировки и старения (p16), был

выделен пептид (82-102) длиной 20 АКО, который *in vitro* моделировал функции полноразмерного белка. Другими словами, если полноразмерный белок ингибировал процессы фосфорилирования циклиновыми киназами, то и функционально активный пептид являлся таким же эффективным ингибитором [56, 377].

Другой пример - для белка p53, контролирующего остановку клеточного деления в ответ на генотоксические воздействия в G2-фазе и активирующего апоптоз при необратимости повреждений, был выделен короткий пептид, отвечающий за активацию апоптоза [205].

Данный подход позволил найти минимальные функциональные последовательности и для ряда других белков, выполняющих важные функции в клетке (например, для p21 – мощного ингибитора пролиферации, или E2F-транскрипционного фактора, играющего одну из ключевых ролей в активации S-фазы клетки) [56, 149].

Таким образом, соединение возможности целевой доставки пептидов в клетку и обнаружение коротких функциональных доменов в ключевых белках-регуляторах создали предпосылки для конструирования молекул, позволяющих направленно манипулировать клеточными функциями. Основное количество работ посвящено возможности использования CPPs в онкологии, в качестве векторов доставки определённых молекул с целью получения цитостатического и цитотоксического эффектов на опухолевые клетки [72, 116, 142, 208].

При использовании CPPs в онкологии необходим тщательный подбор функциональной группы. Достижения в исследовании генома существенно расширили список клеточных мишеней, возможных «точек воздействия» для применения CPPs - опухолевые супрессоры, индукторы апоптоза и регуляторы клеточного цикла [299]. Кроме того, этот подход может быть использован и для исследования внутриклеточных функций различных макромолекул. Как известно, в опухолевых клетках нарушено соотношение процессов дифференцировки и программирования клеточной гибели, поэтому детальное изучение этих

механизмов может помочь в поиске новых возможностей применения технологии CRP [62, 72, 142].

Таким образом, поиск и создание эффективных ингибиторов белковых комплексов остается трудной задачей, требующей участия специалистов в областях молекулярной биологии, математического моделирования, высококвалифицированных экспериментальных биологов. Исследования последних лет, включающие анализ информации молекулярных структур и взаимодействий белков, результаты графических вычислений, использование технологий искусственного интеллекта, позволили разработать ряд молекул, направленно воздействующих на труднодоступные молекулярные мишени, в частности RAS и циклиновые комплексы. Однако, необходимы дополнительные исследования, чтобы подтвердить и улучшить эффективность разработанных молекул, также необходим поиск путей преодоления резистентности опухолей к имеющимся ингибиторам [370].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

На базе ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» Министерства РФ (ФГБУ «РНЦРР» Минздрава РФ) в период с 2002 по 2025 г.г. была проведена фармацевтическая разработка и необходимые доклинические исследования двух потенциальных лекарственных препаратов, обладающих противоопухолевой активностью и воздействующих на ключевые мишени, ответственные за передачу митогенного сигнала в клетке. С учетом дальнейшего клинического применения разрабатываемых препаратов планирование и проведение экспериментальных исследований было согласовано с Методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств («Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А. Н. Миронова. — М.: 2012), национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств».

Последующие клинические исследования были проведены на основании действующей нормативной документации, регламентирующей данные исследования.

Дизайн исследования:

- 1. Первый этап:** разработка и синтез пептидных последовательностей;
- 2. Второй этап:** доклинические исследования *in vitro*
 - выбор оптимальной пептидной последовательности к внутриклеточной мишени;
 - оценка проникающей способности пептидных последовательностей;
 - исследование антипролиферативных и цитотоксических свойств на клеточных линиях, злокачественных новообразований различных локализаций;
 - оценка специфичности воздействия на молекулярную мишень;

— исследование эффектов сочетанного воздействия пептидной последовательности и химиопрепаратов, применяемых в медицинской практике.

3. Третий этап: доклинические исследования *in vivo*

— оценка эффективности при опухолях разных локализаций, оценка зависимости эффектов от способа введения;

— фармакокинетика и метаболизм у животных;

- токсикология (токсичность при однократном введении, подострая токсичность при многократном введении, специфические виды токсичности).

4. Четвертый этап: клинические исследования I/IIa фазы

— разработка протокола клинического исследования;

— подбор дозы лекарственного препарата, оценка параметров безопасности;

— оценка первичной эффективности препарата.

Доклинические исследования *in vivo* (3-й этап) были проведены в соответствии с:

— Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ;

— принципами надлежащей лабораторной практики OECD (OECD Principles on Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98)17));

— Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств (решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81);

— Межгосударственным стандартом «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 33044-2014);

— Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств»;

— Руководством по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов

(решение Совета Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. № 202);

— Методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств («Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А. Н. Миронова. — М., 2012).

Доклинические исследования токсичности были проведены на базе ООО «ЦЕНТР ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ» (ООО «ЦДКИ») — филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ФИБХ). Филиал имеет аккредитацию соответствия принципам надлежащей лабораторной практики (Statement of OECD GLP Compliance), регулярно инспектируется Словацким национальным аккредитационным агентством (Slovak National Accreditation Service) и включён в программу государственной инспекции Росаккредитацией.

Содержание животных и все процедуры с животными выполнены в соответствии с Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении Доклинических (неклинических) исследований», рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ООО «ЦДКИ» (IACUC).

На 4 этапе был создан Протокол клинического исследования №2022-1-Инг-Рас — «Перспективное открытое нерандомизированное многоцентровое I-Фаза исследование с адаптивным дизайном безопасности, переносимости и первичной эффективности, с установлением максимально переносимой дозы препарата на основе ингибитора RAS-ГТФазы (Инг-Рас) для лечения пациентов с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом».

Проведение данного этапа исследования было после получения исходного одобрения Совета по этике Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания № 325 от 17.01.2023г.) и получения

инициального Разрешения Министерства здравоохранения Российской Федерации на проведение клинического исследования №177 от 30.03.2023 г. Также оно осуществлялось в соответствии с:

— Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» от 1964 г. с последующими изменениями и дополнениями;

— трехсторонним соглашением по Надлежащей Клинической Практике (GCP, ICH E6(R2) от 09.11.2016);

— действующим законодательством Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и Российской Федерации (РФ) в отношении клинических исследований лекарственных препаратов:

- Федеральный закон РФ от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ».
- Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- Федеральный закон от 27.07.2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных».
- Надлежащая клиническая практика. Государственный отраслевой стандарт (ГОСТ) Р 52379-2005 (утв. Приказом Ростехрегулирования от 27.09.2005 №232-ст).
- Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 г. № 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата».
- Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
- Решение совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 79 «Об утверждении правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза».

- Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. № 703н г. «Об утверждении формы сообщения о завершении, приостановлении или прекращении клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения».
- Приказ Минздравсоцразвития России № 775н от 31.08.2010 г. «Об утверждении порядка рассмотрения сообщения о необходимости внесения изменений в протокол клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения».
- Приказ Росздравнадзора от 15.02.2017 г. № 1071 «Об утверждении Порядка осуществления фармаконадзора».
- Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 г. № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
- Приказ Минздрава РФ от 29.11.2012 г. № 986н «Об утверждении Положения о Совете по этике».
- Приказ МЗ РФ от 28.04.2022 г. N 294 «Об утверждении состава совета по этике».
- Приказ Минздрава РФ от 07.05.2018 г. № 202н «Об утверждении Порядка размещения информации о составе Совета по этике, планах его работы и текущей деятельности на официальном сайте Минздрава РФ в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

Исследование было начато в исследовательском центре (ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России) только после получения письменного разрешения на проведение исследования и одобрения Совета по этике Минздрава России и Независимого Этического комитета, и получения подписей в протоколе клинического исследования каждой стороны, участвующей в исследовании. Исследователи были ознакомлены с материалами исследования своевременно до его начала. Квалификация исследователей соответствовала требованиям, необходимым для проведения качественных клинических исследований.

На этапе подготовки к проведению КИ, проведена фармацевтическая разработка лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы.

Разработан процесс синтеза активной фармацевтической субстанции и масштабирование производственного процесса с учетом пептидной структуры молекулы. Проведена разработка готовой лекарственной формы (ГЛФ) пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас), определены параметры хранения и стабильности, разработан дизайн упаковки (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Дизайн упаковки ЛП «Инг-Рас, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 10 мг» для клинических исследований

Сформированы документы, обеспечивающие получение препарата в надлежащем для КИ качестве: опытно-промышленный регламент получения лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы; система контроля качества лекарственного препарата; проект нормативной документации на ЛП «Инг-Рас, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 10 мг».

Назначенное в ходе протокола клинического исследования лечение.

На I этапе исследования пациенты последовательно были включены в 3 когорты, которые различались дозировкой исследуемого препарата:

Когорта 1 - 0,45 мг/кг;

Когорта 2 - 0,9 мг/кг;

Когорта 3 - 1,8 мг/кг.

В ходе первого этапа исследования, в котором приняли участие 11 пациентов, десяти включенным пациентам (90,9%) было выполнено двукратное введение исследуемого препарата в соответствии с протоколом. 1 пациент из 1-й когорты (01003) отозвал информированное согласие до момента проведения второго введения исследуемого препарата.

Препарат вводился интраперитонеально (внутрибрюшинно) с помощью внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIPAC) после проведения ревизии органов брюшной полости и биопсии посредством лапароскопического доступа (Рисунок 11).

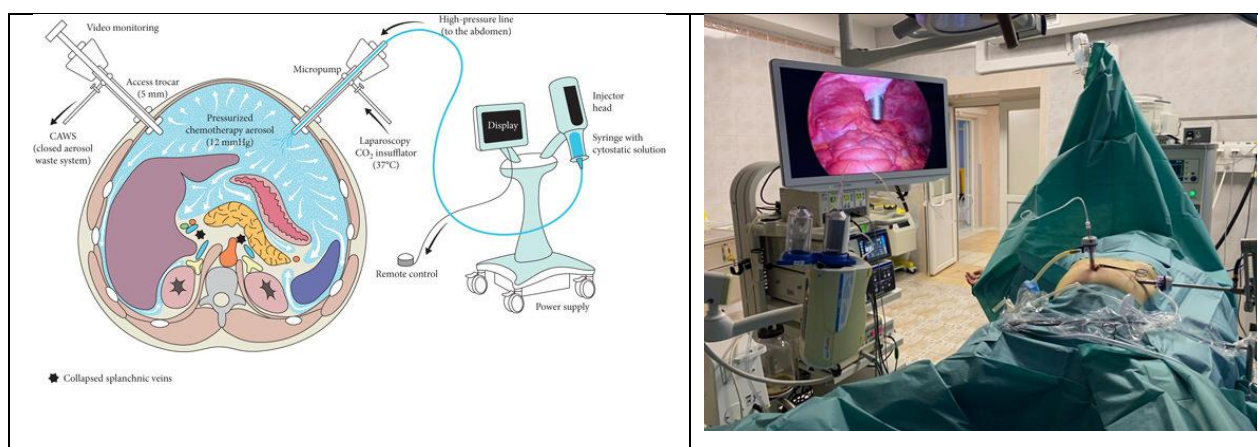


Рисунок 11 – Принцип процедуры внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIPAC)

В соответствии с используемой методикой в условиях комбинированного эндотрахеального наркоза выполнялась пункция брюшной полости в параумбиликальной зоне с наложением карбоксиперитонеума давлением 12 мм рт. ст. После этого устанавливались два троакара размером 10–12 мм. По окончании этапов ревизии и биопсии проводилось введение препарата. Для этого исследуемый препарат в необходимом количестве растворялся в растворе 0,9% натрия хлорида объемом 150 мл и помещался в шприц-колбу автоматического ангиографического инжектора, который подключался посредством магистрали к форсунке, устанавливаемой в одном из троакаров таким образом, чтобы факел форсунки был направлен в зону с наибольшими участками канцероматоза, выявленного при ревизии. Устанавливались следующие параметры работы инжектора: скорость потока 30 мл\мин, максимальное давление 250 PSI,

температура подаваемого раствора -37°C. Активное время работы инжектора - 5 минут. После автоматического прекращения работы форсунки последующая экспозиция составляла еще 30 минут, при этом внутрибрюшное давление сохранялось на заданном уровне – 12 мм рт.ст. Подобные условия позволяли ввести препарат в брюшную полость в виде мелкодисперсного аэрозоля под давлением с равномерным его распределением и более глубоким его проникновением непосредственно в опухолевые ткани по сравнению с обычным внутривентральным введением.

Препарат вводился двукратно с интервалом 7 дней.

Объем вводимого препарата составил 150 мл.

В соответствии с протоколом переход к следующей дозовой когорте осуществлялся только после оценки безопасности предыдущей дозы препарата, который производился Независимым Комитетом по мониторингу данных (НКМД).

2.2 Исследуемые пептидные последовательности

2.2.1 Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Рас)

Физические свойства

Агрегатное состояние: Порошок или лиофилизированная масса от белого до почти белого цвета. Растворимость: легко растворим в воде, растворим в 0,01 М растворе кислоты соляной и 0,01 М растворе натрия гидроксида, практически нерастворим в спирте 95% и в хлороформе. Прозрачность раствора: 0,1 % раствор субстанции в воде и физ. растворе должен быть прозрачным. Цветность раствора: 0,1 % раствор субстанции в воде и физ. растворе должен быть бесцветным. pH: 5,0 до 7,5 (0,1 % раствор субстанции в воде). Осмолярность: от 240 до 360 мОсм/кг. Растворимость в различных растворителях: растворим в воде (на 1 г вещества требуется не более 10 мл воды).

Химические свойства

Эмпирическая формула: C₁₅₄H₂₅₉N₅₃O₃₄; Молекулярная масса - 3397,32 кДа.

Аминокислотная

последовательность:

LysGlnArgThrValValAsnValArgSerArgGlnIleLysIleTrpPheGlnAsnArgArg-Nle-
LysTrpLysLys.

Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Рас) представляет собой последовательность из 26 аминокислотных остатков без какой-либо модификации С- и N-концов или боковых цепей. Имеет следующее химическое название: L- α -Лизин- L- α -Глютаминил- L- α -аргинил- L- α -треонил- L- α -валил- L- α -аспаргинил- L- α -валил- L- α -аргинил- L- α -серил- L- α -аргинил- L- α -глютаминил- L- α -изолейцил- L- α -лизил- L- α -изолейцил- L- α -триптофанил- L- α -фенилаланил- L- α -глютаминил-аспарагинил- L- α -аргинил- L- α -аргинил- L- α -норлейцил- L- α -лизил- L- α -триптофанил- L- α -лизил- L- α -лизин ундекаацетат. Пептидная последовательность продукта (лекарственного средства) в однобуквенном коде: KQRTVVNVRSRQIKIWFQNR-Nle-KWKK. Эмпирическая формула ЛС: C₁₅₄H₂₅₉N₅₃O₃₄ (Молекулярная масса - 3397,32).

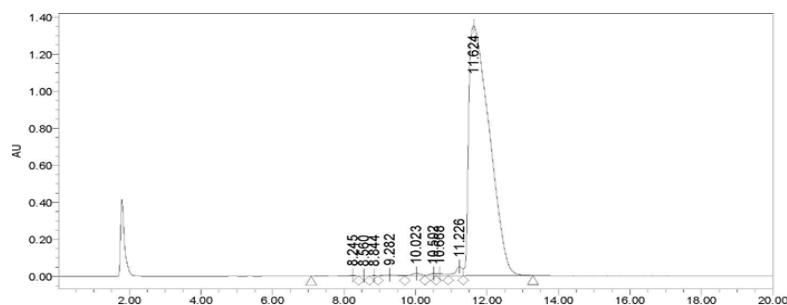
Аминокислотная последовательность пептида Инг-Рас (Ing-Ras) содержит в качестве функциональной группы пептид ингибитор Ras-ГТФазы, и транспортную последовательность – интернализуемый пептид.

Способ получения

Синтез пептида выполняется на полимерной подложке с использованием Fmoc/tBu методологии твёрдофазного метода синтеза пептидов (А-аминогруппа каждой аминокислоты временно блокирована защитной группой Fmoc, функциональные группы боковых цепей также защищены с помощью кислотоллабильных групп). Аминогруппы полимера вводятся во взаимодействие (реакцию конденсации) с активированным производным первой аминокислоты, при этом контроль конверсии реакции ацилирования аминогрупп производится с помощью качественного теста Кайзера. Временная Fmoc-защитная группа удаляется путем обработки 20% раствором вторичного амина в диметилформамиде. Вторая и последующие Fmoc аминокислоты вводятся во взаимодействие с освободившейся аминогруппой растущей пептидной цепи в аналогично, описанных выше процессах для первой аминокислоты.

В результате последовательно выполненных работ по конденсации и деблокированию, образуется пептидная цепь всей целевой молекулы. После наращивания всей пептидной цепи, пептидил-полимер вводится во взаимодействие с раствором нуклеофильных ловушек (скевенджеров) в трифторуксусной кислоте, после чего неочищенный пептид выделяется путем осаждения диэтиловым эфиром. Смесь продуктов реакции подвергается очистке с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Фракции после разделения проверяют на соответствие требованиям спецификации на пептидную последовательность методом обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ. Фракции, соответствующие критериям спецификации на субстанцию, объединяются, подвергаются процедуре ионного обмена и высушиваются.

Партии пептида, соответствующие критериям активной фармацевтической субстанции (АФС), анализируются на соответствие требованиям спецификации, упаковываются и маркируются, рисунок 12 – пример результатов хроматографии раствора пептида.



Peak	RetTime	Type	Width (sec)	Area	Height	% Area
1	8.245	bV	80.000	86538	2888	0.16
2	8.560	VV	18.000	22739	1562	0.04
3	8.844	VV	14.000	22609	2016	0.04
4	9.282	VV	45.000	160565	6382	0.29
5	10.023	VV	34.000	239725	12800	0.43
6	10.502	VV	19.000	166580	12259	0.30
7	10.668	VV	20.000	199729	11737	0.36
8	11.226	VV	25.000	636615	49147	1.15
9	11.624	VB	117.000	53857631	1349864	97.23

Рисунок 12 – Пример результатов анализа качества: * Хроматограмма 0,1 %-го раствора пептида; ** Масс-спектр опытного образца пептида

Фармацевтические свойства и лекарственная форма препарата

В результате проведенной фармацевтической разработки определен состав, условия хранения и основные характеристики лекарственного препарата. Действующее вещество: Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Рас). Международное непатентованное наименование: Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Рас). Торговое наименование: Инг-Рас.

Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (Инг-Рас) представляет собой последовательность из 26 аминокислотных остатков без какой-либо модификации С- и N-концов или боковых цепей. Фармакотерапевтическая группа: противоопухолевое средство. Код АТХ: НП.

Описание: Порошок или лиофилизированная масса от белого до почти белого цвета. Лекарственная форма, дозировка: лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 10 мг. Условия хранения: хранить в защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8°C. Срок годности: 12 месяцев.

2.2.2 Пептидные последовательности, полученные на этапе выбора перспективного кандидата

Ингибитор CDK4/6 (ММ-D37К)

ММ-D37К представляет собой гидрофильный пептид с противоопухолевой активностью, содержащий следующую аминокислотную последовательность: Н-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Arg-Ala-Gly-Ala-Arg-Ser-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH (рус.: Н-Асп-Ала-Ала-Арг-Глу-Гли-Фен-Лей-Асп-Тре-Лей-Вал-Вал-Лей-Гис-Арг-Ала-Гли-Ала-Арг-Сер-Арг-Глн-Иле-Лиз-Иле-Три-Фен-Глн-Асн-Арг-Арг-Мет-Лиз-Три-Лиз-Лиз-ОН).

Молекулярная формула - $C_{201}H_{326}N_{66}O_{49}S_1$; Молекулярная масса - 4483,3.

Описание: белый порошок, растворимый в воде.

ММ-D37К представляет собой искусственно синтезированный методом твердофазного синтеза пептид, включающий функциональную группу - последовательность из белка p16INK4a – ингибитора циклиновых киназ типа D и

интернализуемый вектор, последовательность из белка Antennapedia (pAntp) – антеннапедия, относящаяся к группе CPP (cell penetrating peptides). Биологическая функция pAntp - формирование антенны у личинок мухи *Drosophila Melanogaster*, однако, в настоящее время, имеется большое количество исследований, подтверждающих способность pAntp к интернализации и относящих его к CPP.

Также были проведены исследования пептидных последовательностей, направленных на ингибирование белка Raf – последовательность Raf, взаимодействие E2F1/DP1, последовательности получившие названия E2F1 и DP1 в соответствии с белком связывания. Ингибиторы транскрипционных факторов c-Myc, c-Max, c-Jun, c-Fos, а также соответствующие ингибиторы образования комплексов Циклин D и Cdk4; Циклин A и Cdk2. Аминокислотные последовательности данных пептидов не приводятся в связи с отсутствием на них документов об охране интеллектуальной собственности (патентов).

Все исследуемые пептидные последовательности в качестве вектора внутриклеточной доставки включали последовательность из белка Antennapedia (pAntp), полученные методом твердофазного пептидного синтеза и представляли собой лиофилизированные субстанции с достаточно высокой способностью к растворению.

2.2.3 Лекарственные препараты, используемые в качестве препаратов сравнения

5-Фторурацил-эбеве (5-fluorouracil-ebewe, EBEWE PHARMA Ges.m.b.H.Nfg.KG (Австрия)). Концентрат для приготовления раствора для инфузий 1 мл, активное вещество – фторурацил, 50 мг. Вспомогательные вещества: натрия гидроксид, вода д/и. Фторурацил - антиметаболит урацила. Механизм действия обусловлен превращением препарата в тканях в активный метаболит фторуридинмонофосфат, который является конкурентным ингибитором фермента тимидилатсинтетазы, принимающего участие в синтезе нуклеиновых кислот. Фторурацил нарушает синтез ДНК и вызывает образование

структурно несовершенной РНК, угнетая деление опухолевых клеток. Активные метаболиты локализуются внутри клетки.

Этопозид («Этопозид Эбеве» 100 мг 5 мл, раствор для инъекций, производитель Верофарм, Российская Федерация). Этопозид представляет собой полусинтетическое производное подофиллотоксина. Механизм действия связан с ингибированием топоизомеразы II (фермент, раскручивающий ДНК). Этопозид оказывает цитотоксическое действие за счет повреждения ДНК. Гибель клеток зависит от концентрации этопозидов и длительности его воздействия. Этопозид обладает фазоспецифичным эффектом с остановкой клеточного цикла в S-фазе и в начале G2-фазы, при этом он отличается от других известных препаратов подофиллотоксина, поскольку не вызывает накопления клеток в метафазе, этопозид предотвращает вхождение клеток в стадию митоза и вызывает гибель клеток, готовящихся к митозу. Высокие концентрации препарата вызывают лизис клеток в премитотической фазе. Этопозид также подавляет проникновение нуклеотидов через плазматическую мембрану, что препятствует синтезу и репарации ДНК.

Оксалиплатин («Оксалиплатин Медак» лиофилизат для инфузий 100 мг/фл., производитель Онкотек Фарма Продакшн, Онкомед Мануфэкчуринг а.с. Германия). Оксалиплатин является противоопухолевым препаратом, относящимся к новому классу производных платины, в котором атом платины образует комплекс с 1,2-диаминоциклогексаном и оксалатной группой. Оксалиплатин обладает цитотоксическим действием широкого спектра. Он также проявляет активность *in vitro* и *in vivo* на различных моделях опухолей, устойчивых к цисплатину. В комбинации с фторурацилом наблюдается синергичное цитотоксическое действие. Исследования механизма действия оксалиплатина показали, что водные производные оксалиплатина, образующиеся в результате его биотрансформации, очевидно, взаимодействуют с ДНК с образованием меж- и внутривитаминных мостиков, подавляя таким образом синтез ДНК, что приводит к цитотоксическому и противоопухолевому эффектам.

2.3 Исследования в условиях *in vitro*

2.3.1 Работа с клеточными линиями

В таблице 2 представлен список клеточных линий, использованных при проведении исследований *in vitro*, а также для создания ксенографтных моделей опухолей человека при оценке эффективности пептидных последовательностей в условиях *in vivo*.

Таблица 2 – Клеточные линии, использованные при постановке экспериментальных исследований

Название линии	Локализация опухоли	Каталожный номер	Наличие мутации в генах RAS\RAF
HT29	аденокарцинома толстой кишки	ATCC Number HTB-38	мутация BRAF V600E
HCT116	аденокарцинома толстой кишки	ATCC Number CCL-247	мутация KRAS G13D
OAW-42	карцинома яичника	Accegen Number BSL 58	мутация BRAF с.980+245C>T
OVCAR-3	аденокарцинома яичника	ATCC Number HTB-161	«дикий тип»
A549	аденокарцинома легкого	ATCC Number CRM-CCL-185	мутация KRAS с.34G>A p.G12S
NCI-H1299	немелкоклеточный рак легкого	ATCC Number CRL-5803	Мутация NRAS p.Q61 с.181C>A
NCI-H460	крупноклеточная карцинома легкого	ATCC Number HTB-177	Мутация KRAS p.Q61H с.183A>T
Jurkat	T-лимфобластный лейкоз	ATCC Number TIB-152	Мутация BRAF p.A728 Vc.2183C>T
EJ138 (T24)	Переходно-клеточная карцинома мочевого пузыря	ATCC Number HTB-4	Гиперэкспрессия онкогенного H-Ras (val 12),
5637	Карцинома мочевого пузыря Grade II	ATCC Number HTB-9	CDKN2C (cyclin-dependent kinase inhibitor 2C); RB1 (retinoblastoma 1)

Ведение клеточных культур

Перед культивацией клетки подвергали разморозке и отмывке:

1. Клетки в виале быстро размораживали в инкубаторе при 37⁰C.

2. Размороженную клеточную суспензию помещали в 15 мл полной ростовой среды DMEM с 20% FBS, осторожно перемешивали.
3. Центрифугировали 8 мин. При 300 g.
4. Сливали среду, осадок ресуспендировали в 5 мл среды DMEM с 15% содержанием FBS и засевали клетки во флакон.

Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко, Россия), 50мкг/мл гентамицина и 2 mM L-глутамина. Культивирование осуществлялось в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) в вентилируемых культуральных флаконах при 37⁰C, в 5 % атмосфере CO₂. Мониторинг состояния клеточных культур осуществлялся с помощью микроскопа MCX300 (Micros, Австрия).

Методика получения краткосрочных культур опухолей из операционного материала

Краткосрочные культуры получали из операционного материала. Забор участка для приготовления культуры проводился, по возможности, в кратчайшие сроки после операции и с участием патологоанатома, проводившего визуальное исследование материала. Вырезался участок ткани, в среднем 1,5 см³. Ткань механически размельчалась, суспензия клеток помещалась в среду RPMI1640 (ПанЭко, Россия), содержащую 10% ЭТС, 50мкг/мл гентамицина. Полученную суспензию инкубировали при 37⁰C и 5% CO₂ 24 часа, затем проводили визуальный контроль состояния клеток, оценивали отсутствие/наличие бактериального «зароста», общее количество опухолевых клеток в образце. При отсутствии бактерий в образце и при наличии прикрепленных опухолевых клеток принималось решение о включении данного образца в исследование.

Синхронизация клеточных культур

Для оптимизации результатов проводилась предварительная синхронизация культур в G₀-фазе клеточного цикла. В настоящее время известно большое количество эффективных методов, позволяющих синхронизовать или вызвать остановку пролиферации в определенной фазе клеточного цикла, чтобы исключить влияние «посторонних» соединений, мы использовали метод

обедненной культуральной среды. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ при высокой влажности в течение 3 дней в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка, Sigma-Aldrich, Германия). Далее клетки отмывали от сыворотки центрифугированием в течение 2 мин при 1200 об./мин и переносили в среду, содержащую 0,5% ЭТС в концентрации $1 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл среды. У клеток в условиях обедненной среды замедляются синтез ДНК и скорость деления, клетки переходят в фазу покоя G₀.

Снятие блока синхронизации или выход из синхронизации проводился путем удаления из среды лимитирующего фактора. При использовании метода обедненной среды таким фактором служит отсутствие питательных веществ и замена среды на новую, содержащую 10% ЭТС, служит пусковым механизмом для выхода клеток из фазы G₀. При снятии блока синхронизации происходит инициация роста культуры клеток, причем в течение первого цикла, или даже нескольких, сохраняется синхронность прохождения клетками фаз клеточного цикла.

2.3.2 Методы, используемые в экспериментальных исследованиях *in vitro*

В таблице 3 представлены сведения об основном оборудовании, которое использовалось при экспериментальных исследованиях *in vitro*.

Таблица 3 – Основное оборудование, использованное при экспериментальных исследованиях *in vitro*

Метод/Оборудование	Определяемые параметры
МТТ-тест (планшетный ридер SpectraMax Molecular Devices, США)	Цитотоксический эффект, определение доли функционально активных клеток
ЛДГ-тест (биохимический анализатор Olympus AU480, Beckman Coulter США)	Цитотоксический эффект, оценка количества погибших клеток
Проточная цитофлуориметрия (Cytomix FC 500, Beckman Coulter, США)	двойная окраска AnnexinV-PI, позволяющая оценить уровень апоптоза, окраска CFDA-SE/PI для оценки жизнеспособных клеток, окраска PI оценка пролиферации (распределение клеток по фазам клеточного цикла)
Оценка пролиферации в реальном времени (система RTCA iCELLigence, США)	Изучение цитостатического эффекта, определение основных показателей пролиферативной активности клеток
ПЦР в «реальном времени» (PCR real-time) (ДНК-Технология, Россия)	Оценка изменения экспрессии генов, определение специфичности воздействия
Флуоресцентная микроскопия (Система THUNDER Imager Tissue, Leica GmbH)	Исследования проникающей способности

Цитофлуорометрический анализ

Цитофлуорометрический анализ проводился на проточном цитофлуориметре Cytomix FC 500 (Beckman Coulter, США), в котором в качестве источника излучения используется аргоновый лазер ($\lambda=488$ нм). Полученные данные обрабатывали, используя программу FloMax, версия 3.0. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин. в течение 5-10 мин. Осадок промывали в 1 мл раствора PBS дважды. К полученному осадку добавляли 2мл PBS и тщательно пипетировали. Полученный препарат клеток либо сразу анализировали на проточном цитофлуориметре, либо клетки затем подвергали фиксации и пермеабилзации и окраске с помощью антител.

Анализ уровней апоптоза и некроза в клеточной популяции проводился с помощью оценки связывания аннексина V и пропидия йодида с помощью FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™, США), согласно методике производителя. Накопление производили до 10000 событий. Для настройки режимов компенсации и установки границ квадрантов использовали следующие контроли: неокрашенные клетки; клетки, окрашенные только Annexin V-FITC (без PI); клетки, окрашенные только PI (без Annexin V-FITC). В образце оценивали показатели прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния клеток, интенсивность флуоресценции Annexin V-FITC (FL1) и PI (FL3). После исключения дэбриса (по показателям прямого и бокового светорассеяния) определяли количество Annexin⁺- и PI⁺-клеток в режиме DotPlot (двумерная гистограмма). Количество апоптотических Annexin⁺-клеток определяли в верхнем левом квадранте, клетки в позднем апоптозе (Annexin⁺PI⁺-клетки) оценивали в верхнем правом квадранте гистограммы. Сбор данных и компьютерную обработку осуществляли с использованием программного обеспечения прибора.

Клеточный анализ пролиферации в режиме реального времени

Для динамического исследования процессов пролиферации и клеточного роста использовали прибор RTCA iCELLigence, фирмы ACEA Biosciences (США). Принцип метода основан на измерении импеданса приповерхностного слоя на дне культуральной лунки. Величина импеданса пропорциональна количеству клеток в лунке (или если точнее, площади, занимаемой клетками). Значения сопротивления, измеренные для электродов в индивидуальных лунках, зависят от геометрии электрода, концентрации ионов в лунке и от наличия клеток, фиксированных на электродах. В отсутствие клеток, электрическое сопротивление в первую очередь определяется ионным составом среды на границе раствора/электрода и в растворе. В присутствии клеток они присоединяются к сенсорной поверхности электрода и действуют как изолятор, что приводит к изменению локального ионного окружения на границе раствора/электрода и увеличению сопротивления.

Таким образом, чем больше клеток располагается на электроде, тем сильнее меняется сопротивление этого электрода. Уникальность системы для клеточного анализа iCELLigence в том, что она основана на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически и в реальном времени анализировать клеточный ответ без использования дополнительных маркеров или меток. Добавление ингибиторов роста или цитотоксических агентов к культуре растущих клеток приводит к угнетению роста и/или гибели клеток, что сопровождается снижением регистрируемого импеданса, как абсолютного, так и по сравнению с контрольными лунками, где рост клеток продолжается. Измерение производится периодически в течение всего времени эксперимента, что позволяет регистрировать динамику роста в каждой лунке с заданной периодичностью.

При проведении исследований были использованы планшеты для системы xCelligence E-plate 16 (1x6) и E-plate 8 (ACEA Biosciences, США). Для прикрепления и адаптации клеток внесение их в планшет осуществлялось за 4-6 часов до добавления исследуемой пептидной последовательности. Пептидную последовательность растворяли в культуральной среде и вносили в необходимой концентрации в лунки планшета, дальнейшую инкубацию и детекцию результатов проводили в стандартных условиях культивирования клеток, 37°C, 5%CO₂.

Молекулярно-генетическое исследование, метод ПЦР в «реальном времени»

Использован метод ПЦР «в реальном времени». Образцы клеток после воздействия исследуемой пептидной последовательности и «снятия» с матраса немедленно помещали в стабилизирующий раствор (Ever Fresh RNA, «Sileks», Россия) для сохранности нуклеиновых кислот. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Для постановки двухступенчатой ОТ-ПЦР использовали ген-специфические праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакционную смесь инкубировали при 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Полученную кДНК сразу использовали для постановки ПЦР в реальном времени. ПЦР-анализ выполняли в

двух повторах, каждый объемом 12 мкл, по следующей программе: 15 циклов - 80°C 5 сек, 94°C 5сек.; 1 цикл - 94°C 5 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек. В проведенном исследовании были использованы две панели, 1 - включала 21 ген, 2 –9. Уровень экспрессии мРНК для каждого гена определяли в относительных единицах (о.е.), в качестве референсных генов были использованы: *GUSB*, *B2M* и *HPRT*.

2.4 Исследования в условиях *in vivo*

Процедуры, используемые в данных исследованиях, были, насколько возможно, спланированы таким образом, чтобы избежать или минимизировать для животных дискомфорт, дистресс или боль. Животные, которые испытывают хроническую боль или дистресс были подвергнуты эвтаназии по решению ветеринарного врача и руководителя исследования.

ООО «ЦДКИ» РАН имеет сертификат соответствия принципам надлежащей лабораторной практики (НЛП) Федеральной службы аккредитации (Росаккредитации): Приказ № НЛП-4 от 03.03.2022 (продлен после инспекции 29-30.05.2024); а также сертификат соответствия GLP OECD Турецкого аккредитационного агентства TÜRKAK (AB-0028-IL от 19.03.2024).

2.4.1 Содержание животных

Животные содержались в двухкоридорной барьерной зоне корпуса с автоматической сменой дневного и ночного периода (08:00-20:00 – «день», 20:00-08:00 – «ночь») и как минимум 12-кратной сменой объема воздуха в комнате в час. За стандарты содержания животных приняты стандарты, определенные Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. В качестве приемлемых границ параметров микроклимата в комнатах содержания животных приняты границы, определенные руководством *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington D.C., 2011). Животные во время адаптации и в течение исследования содержались группами (по 2 особи) в клетках открытого типа со сплошным дном и подстилом.

Был использован коммерческий автоклавированный подстил из древесных

чипов (LIGNOCEL BK 8/15, JRS, Germany). Животные получали автоклавированный полнорационный корм для лабораторных животных. Для поения использовалась профильтрованная системой MilliRO Millipore водопроводная вода, *ad libitum* в стандартных питьевых полисульфоновых бутылочках со стальной крышкой и носиком, входящими в комплектацию клеток ИВК. Все животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды в комнате барьерной зоны с двумя коридорами. Диапазоны температур 20-24°C и влажности 45-65% приняты в качестве оптимальных, а диапазоны 20-26°C и 30-70% - в качестве приемлемых.

После получения из питомника животные были доращены и акклиматизированы не менее чем 28 дней до распределения по экспериментальным группам. Во время акклиматизации проводилось ежедневное наблюдение за животными (раз в день для регистрации общего состояния животных в клетках и выявления отклонений); животные с отклонениями не были взяты в исследование (СОП An/12).

Во время распределения по группам все животные были индивидуально промаркированы ушными метками-проколами, взвешены и осмотрены с записью клинических наблюдений. Животные, не имеющие клинических признаков нарушений здоровья, были распределены по группам способом, основанным на выборе по массе тела так, чтобы средне групповые значения к началу экспериментальных процедур не отличалась статистически. По возможности социальная группа (животные в одной клетке) не разрушается и включается в одну экспериментальную группу. Животные, не распределенные по экспериментальным группам, были переведены в резервную популяцию.

2.4.2 Статистический анализ

Для всех количественных данных была применена описательная статистика: посчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением N представлены в итоговых таблицах. Нормальность распределения вариант в группе определяли тестом Shapiro-Wilk при 5% уровне значимости.

Данные были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Newman-Keuls или непараметрического критерия Kruskal-Wallis с последующим тестом множественных сравнений в зависимости от типа распределения количественных данных. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica ver. 7.1. Различия определяли при 5%-ном уровне значимости.

С учетом большого количества разнонаправленных исследований, проведенных в рамках данной работы, дизайн для каждого исследования с участием животных, приведен в главе Результаты собственных исследований.

2.5 Клинические исследования I/IIa фазы

2.5.1 Дизайн клинического исследования

В ФГБУ «РНЦРР» Минздрава РФ проведено первое клиническое исследование I/IIa фазы с участием пациентов, где целью был выбор оптимальной дозы с последующей оценкой безопасности и первичной оценкой эффективности препарата Инг-Рас при его введении пациентам с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом. На 1 этапе мы проводили оценку переносимости препарата Инг-Рас при его однократном и двукратном введении пациентам; оценку безопасности препарата Инг-Рас при его однократном и двукратном введении; а также определили максимально переносимую дозу (МПД) препарата Инг-Рас и рекомендуемую дозу препарата для второго этапа исследования; проводили оценку фармакокинетики препарата Инг-Рас при его однократном введении пациентам с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом. На 2 этапе оценивали безопасность оптимальной дозы препарата Инг-Рас, которая была определена в ходе 1 этапа исследования, а также провели предварительную оценку эффективности препарата Инг-Рас при интраперитонеальном способе введения у пациентов с диагнозами рак желудка и рак толстой кишки с высоким риском развития или наличием перитонеального канцероматоза.

Препарат вводился интраперитонеально (внутрибрюшинно) с помощью внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIPAC). Препарат вводился двукратно с интервалом 7 дней. Объем вводимого препарата составил 150 мл. Дизайн исследования в виде таблицы визитов и процедур, представлен в Таблице 4 для I этапа и Таблице 5 для II этапа исследования.

2.5.2 Описание визитов и процедур клинического исследования

I этап исследования состоял из следующих периодов:

– Скрининг (Дни 3–1) Предварительное обследование пациентов (длительность до 3 дней).

– Визит 1 (Дни 1–14) В День 1 исследования пациентам в условиях стационара однократно интраперитонеально (методом PIPAC) вводился исследуемый препарат в дозе, соответствующей когорте:

- Когорта 1 (0,45 мг/кг);
- Когорта 2 (0,9 мг/кг);
- Когорта 3 (1,8 мг/кг);

После первого введения препарата пациент в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки параметров фармакокинетики (в течение первых 12 часов после введения ИП), переносимости и безопасности. На 8-й день исследования проводилось второе введение препарата с расчётом дозировки, соответствующей текущей когорте. После второго введения препарата пациент также в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки параметров переносимости и безопасности, после чего пациент выписывался из стационара.

– Визит 2 (День 21±1) На день 21±1 пациент совершал амбулаторный визит в исследовательский центр с целью оценки параметров переносимости и безопасности.

– Визит 3, Визит завершения исследования (День 28±1) На день 28±1 пациент совершал амбулаторный визит в исследовательский центр с целью заключительной оценки параметров переносимости и безопасности.

Таблица 4 – Дизайн клинического исследования. График визитов и процедур на этапе I

Процедура	Скрининг	Визит 1 (в условиях стационара)						Амбулаторно	
		Введение препарата 1	Наблюдение		Введение препарата 2	Наблюдение	Визит 2	Визит 3 / Завершение исследования	
			2, 4, 7	3, 5, 6					
День исследования	-3 -1	1	2, 4, 7	3, 5, 6	8	9, 11, 14	10, 12, 13	21(±1)	28(±1)
Подписание информированного согласия, сбор анамнеза	X								
Измерение роста и веса, расчет ИМТ	X	X			X			X	X
Документирование проведенного хирургического лечения	X								
Регистрация предшествующей / сопутствующей терапии и жалоб. Физикальное обследование. Оценка показателей (АД, ЧСС, ЧДД, температура тела)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Критерии включения / невключения	X	X							
Оценка по шкале ECOG	X								
ЭКГ в 12 отведениях	X		X			X			X

Продолжение Таблицы 4

ЭхоКГ	X		X ¹			X ²			
Общий и биохимический анализы крови ²	X	X ³	X			X		X	X
Коагулограмма ⁴	X	X ³	X			X		X	X
Общий анализ мочи	X	X	X			X		X	X
Установка кубитального катетера		X							
Введение препарата		X			X				
Отбор образцов крови для оценки ФК параметров		X ⁵							
Извлечение кубитального катетера		X ⁶							
Регистрация НЯ/СНЯ	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Оценка критериев исключения		X	X	X	X	X	X	X	X

¹ ЭхоКГ на визите 1 будет проводиться на 2-й, 9-й и 14-й день исследования

² Биохимический анализ крови: общий белок, альбумин, креатинин, мочеви́на, глюкоза, общий билирубин, щелочная фосфатаза, АСТ, АЛТ

³ Лабораторные исследования, проводимые в день введения препарата должны проводиться и оцениваться ДО введения исследуемого препарата или накануне дня введения препарата

⁴ Коагулограмма: активированное частичное тромбопластиновое время [АЧТВ], протромбиновое время [ПВ], фибриноген, D-димер

⁵ Отбор образцов крови для оценки фармакокинетических параметров осуществляется в течение 12 часов после введения препарата (по окончанию экспозиции). До введения препарата осуществляется отбор одного образца крови

⁶ Извлечение кубитального катетера через 12 часов после введения препарата

Таблица 5 – Дизайн клинического исследования. График визитов и процедур на этапе II

Процедура	Скрининг	Визит 1 (в условиях стационара)					Амбулаторно			
		Введение препарата 1	Наблюдение		Введение препарата 2	Наблюдение		Визит 2	Визит 3	Последующее наблюдение : Визиты 4 – 8 ¹
День исследования	-14 - -1	1	2, 4, 7	3, 5, 6	8	9, 11, 14	10, 12, 13	21	28	60, 120, 180, 270, 360
Подписание информированного согласия, сбор анамнеза	X									
Измерение роста и веса, расчет ИМТ	X	X ²			X ¹			X ¹	X ¹	
Регистрация предшествующей / сопутствующей терапии и жалоб. Физикальное обследование. Оценка показателей (АД, ЧСС, ЧДД, температура тела)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

¹ В случае, если у пациента было зарегистрировано прогрессирование заболевания дальнейшие визиты последующего наблюдения могут быть проведены в форме телефонных звонков (выполнение диагностических процедур не требуется)

²Измерение только массы тела (в дни введения препарата – ДО введения)

Продолжение Таблицы 5

Критерии включения / невключения	X	X								
КТ/МРТ. Оценка опухоли по критериям RECIST 1.1. Оценка индекса перитонеального карциноматоза (ПКИ)	X								X	X ³
Оценка по шкале ECOG	X									X
ЭКГ в 12 отведениях	X		X			X			X	
Клинический анализ крови ⁴ . Биохимический анализ крови. Коагулограмма. Общий анализ мочи	X	X ⁵	X			X		X	X	X
Введение препарата		X			X					
Регистрация НЯ/СНЯ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Оценка критериев исключения		X	X	X	X	X	X	X	X	X

³ Проведение КТ / МРТ и оценка прогрессирования заболевания проводится на 180 и 360 дни исследования – обязательно, на 60, 120, 270 дни – по клиническим показаниям.

⁴ Клинический анализ крови: гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов, СОЭ

⁵ Лабораторные исследования, проводимые в день введения препарата должны проводиться и оцениваться ДО введения исследуемого препарата или накануне дня введения препарата

II этап исследования состоял из следующих периодов:

– Скрининг (-14-1)

Предварительное обследование пациентов (длительность до 14 дней).

– Визит 1 (Дни 1–14)

В день 1 исследования пациентам в условиях стационара внутривенно (методом РПАС, п. 6.3) был введен исследуемый препарат в дозе, определенной по результатам первого этапа исследования. После первого введения препарата пациент в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки безопасности.

На 8-й день исследования было проведено второе введение препарата. После второго введения препарата пациент в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки параметров переносимости и безопасности, после чего пациент будет выписан из стационара.

В дни 21, 28, 60, 120, 180, 270 пациент совершал амбулаторный визит в исследовательский центр с целью оценки параметров и безопасности. День 360 - визит завершения исследования.

2.5.3 Популяция пациентов

В рамках I этапа планировалось включить до 18 пациентов с последовательным включением пациентов на каждом дозовом уровне по схеме «3+3», т. е. каждая дозовая когорта могла содержать от 3 до 6 пациентов.

При этом планировалось использовать следующий алгоритм включения пациентов: первоначально в первую когорту планировалось включить 3 пациентов. Если в течение не менее 7 дней после второго введения препарата в дозе, соответствующей когорте, ни у одного из пациентов не развивалась дозолимитирующая токсичность (ДЛТ), то набор в текущую когорту должен был быть завершён. Следующие 3 пациента должны были быть включены в следующую когорту. Если же у 1 из 3 пациентов текущей когорты развилась бы ДЛТ, то следующие 3 пациента должны были получать препарат в той же дозировке (т.е. включаться в текущую когорту). В случае, если ни у одного из

этих 3 дополнительных пациентов не возникла бы ДЛТ (т.е. суммарно ДЛТ наступала только у 1/6 пациентов), предполагалось продолжить повышение дозы в этом случае. Если же у 1 из 3 дополнительных пациентов развилась бы ДЛТ (т.е. суммарно ДЛТ наступила у 2/6 пациентов), то повышение дозы должно было быть прекращено, а предыдущая доза должна была рассматриваться как МПД. Если при назначении очередного уровня дозировки первым трем пациентам у 2 из них развилась бы ДЛТ (т. е. ДЛТ наступила у 2/3 пациентов), то повышение дозировки должно было быть прекращено, а предыдущая доза рассматривалась бы как МПД. При этом включение пациентов в когорту следующего дозового уровня разрешалось только после того, как у последнего пациента из предыдущей когорты проходило минимум 14 дней от момента последнего введения препарата. В каждую когорту включались только новые пациенты; включать одного и того же пациента в более чем одну дозовую когорту было запрещено протоколом.

Поэтапное включение в следующую дозовую когорту пациентов проводилось только после получения положительного заключения НКМД о возможности повышения дозировки и перехода в следующую когорту.

В итоге, в рамках I этапа было включено 11 пациентов:

В 1 когорту (доза ИП – 0,45 мг/кг) было включено – 4 пациента

Во 2 когорту (доза ИП – 0,9 мг/кг) было включено – 3 пациента

В 3 когорту (доза ИП – 1,8 мг/кг) было включено – 4 пациента

Включение дополнительных пациентов в 1-ю и 3-ю когорту было связано с случившимся досрочным выбытием пациентов из этих когорт; при этом, досрочное выбытие не было связано с проявлениями дозолимитирующей токсичности.

В рамках II этапа планировалось включить 36 пациентов, соответствующих всем критериям включения и не имеющих ни одного критерия невключения.

Группа исторического контроля (этап II): пациенты с диагностированной опухолью желудочно-кишечного тракта, осложнённой канцероматозом брюшной полости или с высоким риском этого осложнения, после хирургического вмешательства с последующей химиотерапией.

В итоге, в рамках II этапа было скринировано 37 пациентов и включено в исследование 36 пациентов, подписавших форму информированного согласия.

Таким образом, в рамках I этапа исследования (оценка клинической безопасности, фармакокинетических параметров препарата Инг-Рас (пептидный ингибитор RAS-ГТФазы)) были включены и проанализированы данные 11 пациентов.

Популяция всех включенных пациентов – т. е. полный набор данных для анализа (full analysis set, FAS) составила 11 пациентов.

Популяция безопасности (Safety) – все пациенты, получившие хотя одну дозу исследуемого препарата – в рамках I этапа составила 11 пациентов.

Популяция для анализа фармакокинетических параметров – пациенты, от которых получена, по крайней мере, одна проба для фармакокинетического анализа с концентрацией исследуемого препарата \geq НПКО при одном измерении также составила 11 пациентов.

В рамках II этапа исследования (оценка безопасности и первичная оценка эффективности препарата Инг-Рас – пептидный ингибитор RAS-ГТФазы) были включены и проанализированы данные 35 пациентов.

Популяция ITT для оценки эффективности составила 35 пациентов.

Популяция PP для оценки эффективности составила 23 пациента.

2.5.3.1 Критерии включения

1. Подписанное письменное информированное согласие пациента.
2. Пациенты мужского и женского полов в возрасте от 18 до 75 лет, включительно, на момент подписания информированного согласия.
3. Пациенты после хирургического вмешательства по поводу одного из состояний, перечисленных ниже:
 - Резектабельный рак желудка, имеющий признаки прорастания в серозную оболочку (T3);
 - Резектабельный рак желудка с наличием опухолевых клеток при исследовании перитонеального смыва по данным

цитологического/иммуноцитохимического исследования и/или имеющий признаки инвазии в соседние органы (T4) по данным предоперационного обследования и/или интраоперационной ревизии;

– Резектабельный рак желудка после проведенного радикального хирургического лечения с гистологически подтверждённым наличием регионарных метастазов (N+);

– Резектабельный рак ободочной кишки, имеющий признаки прорастания серозной оболочки (T3) и/или инвазии в соседние органы (T4) по данным предоперационного обследования и/или интраоперационной ревизии;

– Резектабельный рак ободочной кишки после проведенного радикального хирургического лечения с гистологически подтверждённым наличием регионарных метастазов (N+);

– Резектабельный рак прямой кишки, имеющий признаки инвазии мезоректальной фасции и/или наличия метастатических лимфоузлов в мезоректуме по данным предоперационного обследования;

– Пациенты после хирургического лечения рака прямой кишки, имеющие критерии качества выполненной тотальной мезоректумэктомии (TME) по P. Quirke как удовлетворительные (grade 2), так и неудовлетворительные (grade 1) по данным морфологического исследования удаленного препарата;

– Пациенты с прогрессированием ранее радикально пролеченного рака желудка или колоректального рака в виде изолированного перитонеального канцероматоза.

4. Адекватная функция кроветворения и внутренних органов по результатам лабораторных исследований: (количество нейтрофилов $>1500/\text{мм}^3$, гемоглобин $> 9,0$ г/дл (90 г/л), количество тромбоцитов $>100\ 000/\text{мм}^3$); общий билирубин $\leq 1,5$ верхней границы нормы; АСТ и АЛТ $\leq 2,5$ верхней границы нормы, сывороточный креатинин \leq верхней границы нормы ИЛИ расчетная скорость клубочковой фильтрации ≥ 50 мл/мин.

5. Общее состояние пациента по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) оценивается от 0 до 2 баллов.

6. Согласие пациента на использование надежных методов контрацепции на протяжении всего исследования и в течение 7 дней после его окончания (в случае отсутствия документально подтвержденного факта бесплодия). В исследовании могут принять участие.

2.5.4 Критерии оценки результатов клинического исследования

Критерии оценки переносимости (оценка проведена на I этапе):

Критерием переносимости исследуемого препарата (ИП), которая оценивалась в рамках I этапа, было число пациентов с развившейся дозо-лимитирующей токсичностью (ДЛТ) и характер реакций ДЛТ. На этом основании должна быть рассчитана Максимальная переносимая доза (МПД).

Реакциями ДЛТ должны были считаться любые из следующих нежелательных явлений, связанных с применением препарата (*вероятность связи возникновения НЯ с приёмом препарата должна была быть определена как «определенная» или «вероятная» связь*):

1. Негематологическая токсичность степени 3 или выше в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института онкологии США (СТСАЕ), версия 5.0, которая не может быть устранена рутинными поддерживающими мерами (например, противорвотными, противодиарейными, антигистаминными препаратами).

2. Нейтропения 4 степени продолжительностью >5 дней.

3. Фебрильная нейтропения любой степени или продолжительности в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института онкологии США (СТСАЕ), версия 5.0.

4. Тромбоцитопения 4 степени или тромбоцитопения 3 степени, ассоциированная с кровотечением.

5. АЛТ в 3 и более раз выше верхней границы нормальных значений и общий билирубин в 3 и более раз выше верхней границы нормальных значений.

6. Любая токсичность степени 2 и выше по СТСАЕ, версия 5.0, которая, по мнению Исследователя и Спонсора может быть определена как дозолимитирующая.

7. Снижение фракции выброса левого желудочка 3 степени и выше.

Безопасность:

Оценка безопасности проводилась на I и II этапах исследования.

Первичные критерии оценки:

Частота, тип, связь с введением исследуемого препарата и тяжесть нежелательных и серьезных нежелательных явлений (в том числе клинически значимых отклонений лабораторных параметров и результатов инструментальных обследований).

Оценивалась по данным:

- Жалоб;
- Результатов физикального осмотра;
- Результатов оценки ЧСС, АД, ЧДД
- Результатов оценки температуры тела;
- Лабораторного мониторинга (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, общий анализ мочи);
- Оценки ЭКГ.

Вторичные критерии оценки:

Частота нежелательных явлений (НЯ), связанных с процедурой РРАС (НЯ, для которых связь с процедурой классифицирована как «определенная» или «вероятная»).

Все неблагоприятные события были закодированы терминологией MedDRA, актуальной на момент проведения анализа. Они представлены предпочтительным термином (PT) и классом системного органа (SOC). По итогам проведенного I и II этапов исследования представлены таблицы частот реакций ДЛТ для каждой из когорт, а также имеется разделение по характеру реакций.

Также по итогам проведенного I и II этапов исследования рассчитаны частоты всех нежелательных и серьезных нежелательных явлений, также указаны

частоты НЯ с разделением по классам и предпочтительным терминам, согласно терминологии MedDRA, по степени тяжести, степени взаимосвязи с применением исследуемого препарата, действиям в отношении пациента и препарата, исходу НЯ.

Эффективность:

Оценка эффективности проводилась на II этапе исследования на основании следующих показателей:

1. Общая выживаемость (OS) [Временные рамки оценки - 12 месяцев].

OS определяется как время от даты проведения хирургического вмешательства* до даты смерти пациента (от любой причины). Для пациентов, для которых информация о смерти не собрана в клинической базе данных, в качестве точки отсечки будет использоваться самая поздняя дата, о которой известно, что они живы.

2. Выживаемость без прогрессирования (PFS) [Временные рамки оценки - 12 месяцев].

PFS определяется как время от даты проведения хирургического вмешательства* до даты задокументированного факта прогрессирования заболевания (в соответствии с критериями RECIST 1.1) или смерти (от любой причины).

3. Оценка динамики индекса перитонеального канцероматоза (ИПК).

*Для пациентов с прогрессированием ранее радикально пролеченного рака желудка или колоректального рака в виде изолированного перитонеального канцероматоза датой отсчета для оценки PFS являлась документально подтвержденная дата выявления перитонеального канцероматоза.

2.5.5 Статистические методы анализа результатов

Анализ данных выполнен в программе R-Studio версии 2023.06.1 с использованием языка R версии 4.2.2. Статистический анализ проводился для данных по всем пациентам, принявшим участие в исследовании в соответствии с определениями популяций для проведения анализа.

Непрерывные (количественные) данные представлены в виде количества наблюдений, среднего арифметического, 95 % доверительного интервала (ДИ) для среднего (если не указано иное), стандартного отклонения, медианы, межквартильного размаха, минимума и максимума. Порядковые, категориальные и качественные представлены в виде абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) и 95 % ДИ (если не указано иное).

Оценка эффективности:

Оценку выживаемости проводили по методу Kaplan – Meier.

Были оценены следующие показатели:

- Уровень общей выживаемости (доля пациентов, выживших в течение 1 года).
- Уровень выживаемости без прогрессирования (доля пациентов, у которых не наступило прогрессирование заболевания в течение 1 года).
- Если период наблюдения (12 месяцев) окажется достаточным, будет также оценена медиана выживаемости без прогрессирования (период времени, в течение которого прогрессия наступит у 50% пациентов).

Была проведена сравнительная оценка эффективности метода с данными исторического контроля.

В качестве популяции исторического контроля использовали данные статей: Каприн А.Д. и др. 2024 г.; Janjigian Y.Y. et al. 2021; Sánchez-Hidalgo J.M. et al. 2019; Nors J. et al. 2024; Balboa-Barreiro V. et al. 2024; Zhang Z.T. et al. 2024; Joshi S.S. et al. 2018; Fedyanin M. et al. 2020 [8, 9, 55, 108, 123, 173, 179, 267, 315, 407].

Оценка безопасности:

Для всех исходных показателей (демографических и других исходных данных) была представлена описательная статистика. Количественные данные сравнивались между 3 когортами с помощью теста Краскела-Уоллеса. Сравнение частот показателей проводилось с помощью точного критерия Фишера.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПЕПТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (результаты собственных исследований)

3.1 Выбор мишеней

Первый этап исследований, направленный на выбор наиболее перспективных молекулярных мишеней и разработку пептидных последовательностей, обладающих способностью к их ингибированию, опирается на анализ литературных данных, посвященных изучению внутриклеточных взаимодействий, молекулярных структур соответствующих белковых комплексов и определению структуры пептидных последовательностей, которые являются потенциальными ингибиторами клеточной пролиферации.

На основании литературных источников проведен анализ наиболее важных молекул путей передачи митогенного импульса и последующих факторов, имеющих наибольшее значение в контроле процессов пролиферации и высокую частоту повреждений в злокачественных опухолях. В подавляющем большинстве взаимодействий между молекулами сигнальных путей основой передачи сигнала является образование белковых комплексов (Рисунок 1) [371].

Результаты исследований, представленных в литературе, показывают, что ингибирование образования наиболее важных комплексов передачи сигнала пролиферации будет являться фактором, останавливающим пролиферацию [53, 268].

Опираясь также на частоту обнаружения мутаций или сведения об изменениях конформации или уровня экспрессии соответствующих белков при опухолях различных локализаций, нами были выделены «точки интереса» - соответствующие белковые комплексы, являющиеся одними из ключевых при передаче пролиферативных сигналов (Рисунок 13) [100, 139, 260, 352, 415]. На Рисунке 13 отмечены точки воздействия, на которые были подобраны соответствующие ингибиторы.

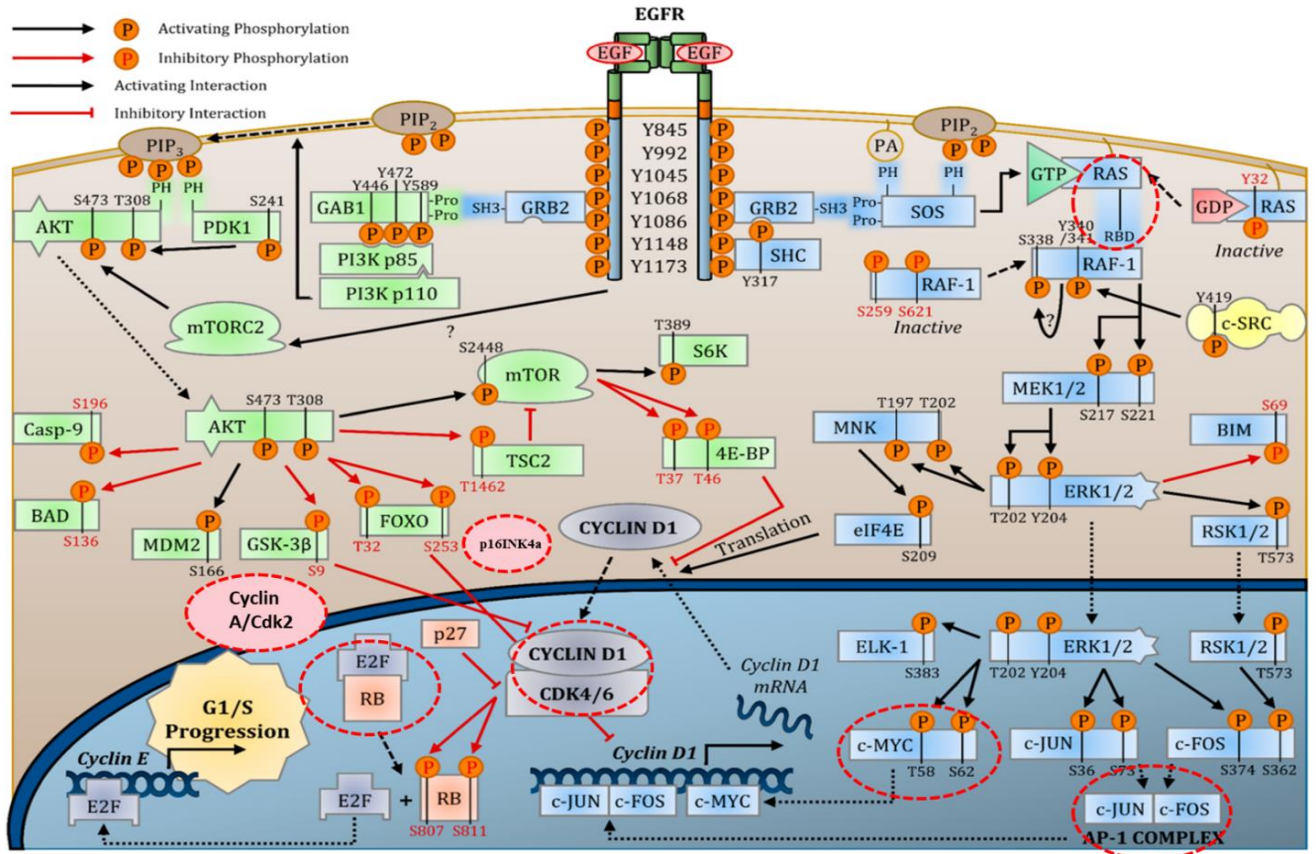


Рисунок 13 – Ключевые молекулы передачи митогенного импульса

Примечание – красным пунктиром отмечены перспективные мишени для поиска эффективных ингибиторов пролиферации

На рисунках 14-19 представлены молекулярные 3-d комплексы, в отношении которых проходил поиск соответствующих ингибиторов.

Двойной комплекс Ras-GTP с высокой афинностью связывает Raf-киназу, в результате чего образуется активный тройной комплекс Ras-Raf-GTP, который фосфорилирует MEK киназу и, тем самым, передает сигнал дальше по каскаду киназ (Рисунок 14) [53, 371]. Мутации Ras, приводящие к гиперактивации сигнального пути MAPK/ERK, приводят к тому, что Ras-киназа постоянно находится в комплексе с GTP, за счет чего опухолевые клетки приобретают способность к неконтролируемому делению, мутации генов Ras-ГТФаз встречаются более чем в 25% всех опухолей человека. А при опухолях некоторых локализаций, например, рак поджелудочной железы, их частота достигает 90% [141, 357].

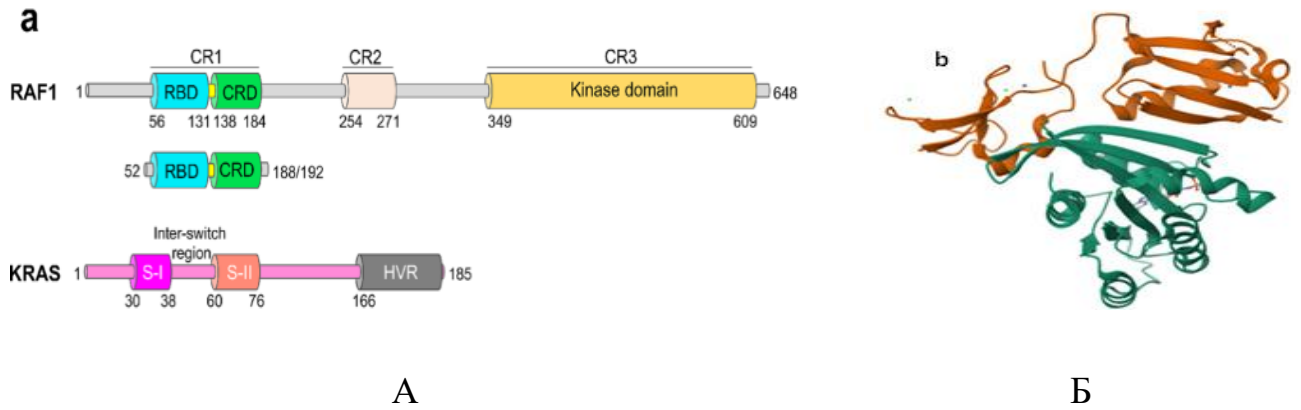


Рисунок 14 – Комплекс Ras/Raf

Примечание – А. Доменная архитектура Raf1 и KRas. Показаны ключевые домены и их границы. Б. Молекулярная кристаллическая структура комплекса KRas/Raf [357]

Комплекс белков c-Jun/c-Fos (AP-1) является ключевым фактором транскрипции (Рисунок 15), регулирующим широкий спектр клеточных процессов, включая пролиферацию, апоптоз, дифференцировку и клеточную миграцию, также ответственен за ряд процессов репарации [90, 390].

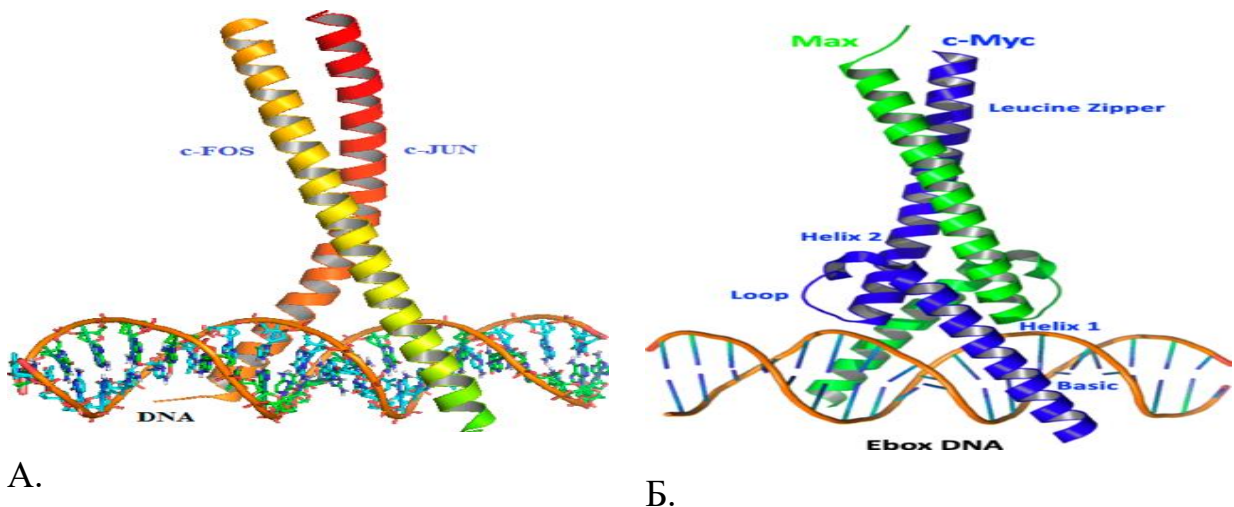


Рисунок 15 – Структура комплекса c-Jun/c-Fos

Примечание – А. В результате образования комплекса между белками c-Jun/c-Fos происходит формирование одного из ключевых факторов транскрипции – белка активации (AP-1). Б. Кристаллическая структура димера c-Myc/Max, связанного с ДНК [389]

Результаты ряда исследований подтверждают, что AP-1 играет важную роль при различных заболеваниях, включая онкологию, фибросклероз, а также воспалительные и аутоиммунные расстройства, такие как астма, псориаз и

ревматоидный артрит. За последнее десятилетие AP-1 стал активно изучаемой мишенью разработки лекарственных препаратов [397, 406], однако ни один эффективный ингибитор AP-1 до сих пор не одобрен для клинического использования.

С помощью методов белковой инженерии активно ведутся исследования по разработке новых терапевтических средств, нацеленных на комплекс c-Myc/Max, по сути являющийся драйвером в более чем 70% злокачественных новообразований [235].

Гетеродимерный комплекс c-Myc/Max регулирует экспрессию большого числа генов за счет связывания специфического сайта ДНК Enhancer box (E-box) и активирует транскрипцию нижестоящих генов. Большинство известных «традиционных» малых молекул, ингибирующих MYC, в исследованиях *in vivo* сталкиваются с рядом существенных ограничений, включая токсические эффекты, а также проблемами с эффективной внутриклеточной доставкой и развитием резистентности. В настоящее время возлагаются большие надежды на создание белковых препаратов способных воздействовать и нарушать образование комплекса c-Myc/Max и/или связывание c-Myc/Max с определенными мишенями ДНК. Разработанные связывающие ДНК белки, такие как Otomyc, DuoMyc, ME47, MEF и Mad, ингибируют активность MYC посредством специфических механизмов димеризации, секвестрации и связывания ДНК. По сравнению с малыми молекулами эти генно-инженерные конструкции обеспечивают высокую специфичность и эффективность, что позволяет надеяться на скорую разработку новых высокоэффективных препаратов, а также подчеркивает важность методов белковой инженерии в разработке терапевтических молекул [118, 119].

На рисунке 16 представлена трехмерная структура комплекса циклин D/Cdk4, образование данного комплекса опосредовано митотическим импульсом по Ras-сигнальному пути. Именно активация Cdk4 вследствие связи с циклином D и последующее фосфорилирование белка ретинобластомы (Rb), является

пусковым механизмом для выхода клетки из фазы покоя (G0) и преодоление G1-фазы [141].



Рисунок 16 – 3D-структура комплекса белков циклина D (оранжевый) и Cdk4 (зеленый цвет) (PDB ID: 2W9Z)

Активация Cdk4 запускает фосфорилирование pRb, выход транскрипционного фактора E2F1 из комплекса и связывание его с белками DP1/2, обеспечивающими стабильность связывания E2F1 с ДНК (Рисунок 17) [304].

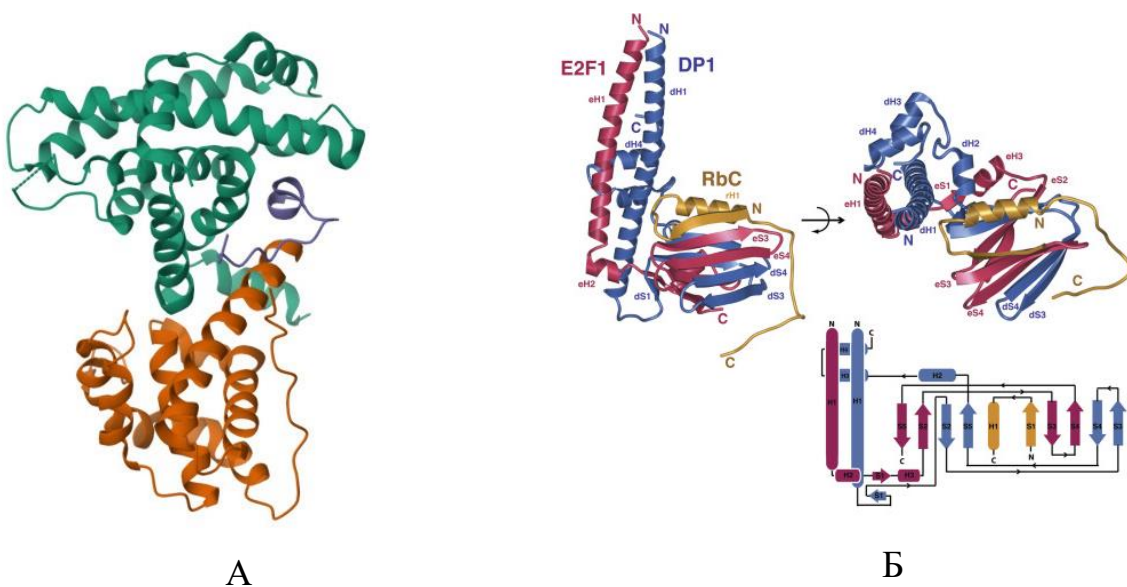


Рисунок 17 – 3D-структура комплекса E2F1-DP1.

Примечание – А. Кристаллическая 3-D структура комплекса pRb- E2F1. Б. Структура тройного комплекса C-концевого домена Rb, связанного с гетеродимером E2F1-DP1 [382]

Таким образом, фосфорилирование pRb снимает с E2F блок, ингибирующий его транскрипционную активность, что способствует дальнейшему продвижению клеточного цикла [63, 120].

Транскрипционная активность E2F приводит к последовательной экспрессии генов, необходимых для перехода G1/S, включая Циклин E в конце G1. Это в свою очередь активирует образование комплекса cdk2/Циклин E, дальнейшее фосфорилирование Rb и полное высвобождение и стимуляцию факторов E2F, которые с высокой активностью проявляют свойства активаторов транскрипции и обеспечивают прохождение G1-фазы [63, 382].

Образование комплекса cdk2/Циклин E координирует вход в S фазу посредством дополнительного/гиперфосфорилирования белков семейства Rb, тем самым совершенно деактивируя их функциональную активность. Происходит инициализация синтеза ДНК, репликация и переход через S-фазу вместе с образованием комплекса cdk2/Циклин A (Рисунок 18).

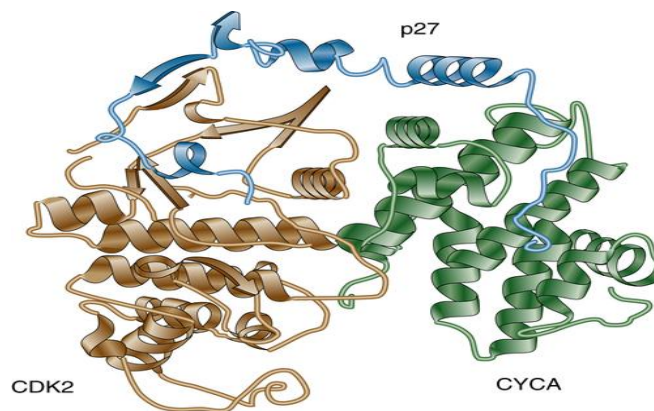


Рисунок 18 – Комплекс циклин A/ Cdk 2 /p27 KIP1

Примечание – кристаллическая структура комплекса циклин A/Cdk 2 и молекулы-ингибитора p27 Kip1 [150].

Комплекс cdk2/Циклин A инициирует активацию образования комплекса ЦДК1/Циклин B в центросомах и ядре во время прохождения G2- фазы, а на позднем этапе G2 Циклин A связывается с Cdk1 и заменяет Циклин B в комплексе, что способствует координации входа и прохождению клеткой фазы митоза [63, 139, 150].

Образование и активация комплексов Cdk /Циклин контролируется на нескольких уровнях, включая обратимую/реверсивную активацию, ингибирование процессов фосфорилирования и взаимодействие со структурными ингибиторами [90, 367, 390]. Преждевременная активация Cdk контролируется путем фосфорилирования остатков (остаточных концентраций), что приводит к блокировке нуклеотид-связывающего кармана (пептидного кармана взаимодействия) и предотвращает связывание АТФ, данный механизм ингибирования специфичен, например, для Cdk1 (фосфорилирование Thr14 и Tyr15) и Cdk 2. Снятие такого блока происходит за счет активации Cdc25 фосфатаз и Cdk-активирующей киназы САК (на Thr160 для Cdk 2) [54, 148, 395].

В настоящее время описано большое количество структурных ингибиторов Cdk (СДКИ): белки двух семейств INK4 и CIP/KIP, вступая во взаимодействие с Cdk или Циклинами, обеспечивают их структурную конформацию/стабильность, что препятствует активации комплексов Циклин – Cdk. Ингибиторы семейства INK4 - p16, p15, p18 и p19, состоят из анкириновых повторов, они связываются с мономерами Cdk4/6 или комплексами Cdk4/6 – Циклин Д (Рисунок 19).

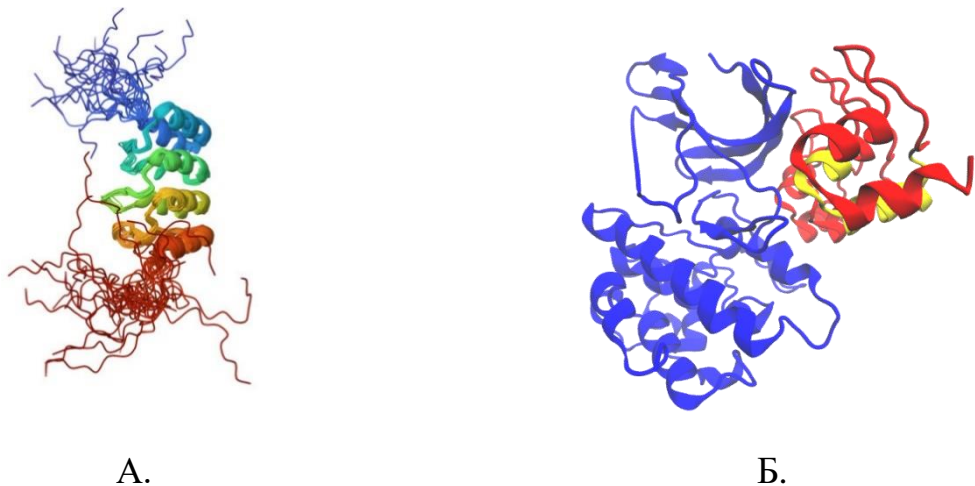


Рисунок 19 — 3D-структуры мономера p16INK4A и комплекса CDK6/ p16INK4A
 Примечание – А. ЯМР-структура супрессора опухоли p16INK4A;
 Б. 3-D структура комплекса CDK6 + p16INK4A [148, 394]

Белки семейства INK4, включающее p16INK4a, обладают достаточно узкой специфичностью взаимодействия с Cdk4/6, данные ингибиторы препятствуют

образованию их комплексов с циклинами D, что приводит к остановке процессов пролиферации. Основной биологической функцией p16INK4a является регулирование клеточного цикла за счет блокирования перехода из G1 в S фазу по pRb-зависимому механизму. Ген ингибитора опухолевого роста p16INK4a часто инактивирован в опухолях различной локализации. Нарушение его функциональной активности в опухолях происходит либо путем метилирования промотора, либо в результате возникновения соматических мутаций и наблюдается с частотой до 80%, особенно это характерно для таких высокоагрессивных опухолей как рак поджелудочной железы, глиомы, лимфолейкоз и др. Ген ингибитора опухолевого роста p16INK4a часто инактивируется в опухолях различной локализации. В большом количестве исследований показано, что восстановление активности p16INK4a в опухолевых клетках может способствовать их гибели и иметь терапевтический эффект. Ингибиторы CIP/KIP, p21Cip1, p27Kip1, p57Kip2, содержат специфические мотивы связывания и блокируют образование комплексов Cdk 2/Cyclin A/E, однако, показано, что они также способны стимулировать связывание и внутриядерную доставку Cdk 4/Циклин D [54, 148, 150].

Опосредованная или нерегулируемая гиперактивность Cdk и/или транскрипционных факторов вследствие усиления экспрессии или мутаций, способствует пролиферации клеток опухолей, аберрантная активность обнаруживается в большинстве злокачественных новообразований [34, 147, 403].

Таким образом, выбранные нами для исследования циклин-зависимые киназы и транскрипционные факторы являются биомаркерами пролиферации и представляют собой привлекательные фармакологические мишени для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Структурные особенности некоторых Cdk и молекулярные механизмы их регуляции в настоящее время достаточно хорошо изучены и описаны, что создает предпосылки для поиска и разработки лекарственных препаратов – ингибиторов Cdk [252, 355, 402].

Однако, большинство Cdk представляют собой достаточно трудную терапевтическую мишень в силу своих структурных особенностей и наличия АТФ-зависимого «кармана связывания» [46, 182].

Изучение естественных ингибиторов Cdk и использование методов структурного анализа оценки взаимодействия циклинов и Cdk, позволило синтезировать малые молекулы - пептиды, обладающие свойствами ингибиторов Cdk. Большая часть полученных ингибиторов нацелена на «карманы связывания», но также синтезирован ряд молекул, проявляющих ингибиторные свойства за счет взаимодействия с местом связывания комплекса белок-белок. Также есть небольшое количество публикаций, в которых ингибитор взаимодействует с другими участками молекулы Cdk [87, 276].

Следующей задачей являлся поиск пептидных конструкций, которые представляют собой потенциальные ингибиторы образования соответствующих комплексов. Для решения этой задачи на первом этапе из базы данных 3D-структур белков RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) <https://www.rcsb.org/> получены последовательности аминокислот соответствующих белков, формирующих активные комплексы, отвечающие за передачу митотического сигнала. Далее выполнен анализ структур этих молекул и комплексов. На основе структурных данных были изучены поверхности взаимодействия белков c-Myc/Max, c-Jun/c-Fos, E2F1/DP1, Ras-GTP/Raf, циклина D и Cdk4, циклина A и Cdk2, p16INK4a/Cdk4/6, определены возможные поверхности структуры белков, экранирование которых будет способствовать блокировке взаимодействия со вторым белком комплекса. Далее была разработана стратегия поиска пептидных ингибиторов белковых комплексов, объединяющая методы компьютерного моделирования, белкового докинга и молекулярной динамики. С помощью методов математического моделирования с применением пакета символьной математики Wolfram Mathematica, были подобраны пептидные последовательности, гомологичные связывающим участкам исследуемых белковых комплексов.

Поисковый анализ опирался на информацию о химическом составе пептидов, модель последовательности и определение свободных энергий связи (док-баллов) для поиска пептидных последовательностей, которые образуют белок-пептидные комплексы с более высокими значениями энергии взаимодействия.

Методами математического моделирования были получены трехмерные пространственные структуры последовательностей, исследованы их способности связываться с целевым белком и, на основании расчетов энергии взаимодействия, оценена способность образовывать комплексы и проявлять функции ингибиторов циклиновых киназ и транскрипционных факторов. Проведенные расчеты позволили выделить тринадцать пептидных последовательностей, которые образовывали наиболее устойчивые комплексы с транскрипционными факторами c-Myc/Max, c-Jun/c-Fos, E2F1/DP1, Ras-GTP/Raf, циклинами и циклин-зависимыми киназами: циклин D и Cdk4, циклин A и Cdk2, а также пептидная молекула – короткий модифицированный фрагмент p16INK4a, способный эффективно связываться с Cdk6.

Данный набор химерных пептидов, состоящих из ингибитора целевого белка и интернализуемой последовательности Antp, был синтезирован с помощью твердофазного пептидного синтеза. Последующие исследования включали оценку антипролиферативной/противоопухолевой активности разработанных последовательностей с целью определения наиболее перспективного кандидата для полномасштабных доклинических исследований.

3.2 Оценка первичной эффективности разработанных пептидных последовательностей

Для оценки первичной эффективности полученного спектра последовательностей был выбран метод RTCA iCELLigence, позволяющий оценить динамику пролиферации клеточной культуры в режиме «реального времени», а также одновременно сопоставить воздействие нескольких агентов или нескольких концентраций на исследуемые клетки.

Анализ был проведен с использованием двух клеточных линий опухолей человека: A549 (аденокарцинома легкого) и HT29 (аденокарцинома толстой кишки). На клетки, предварительно высаженные в лунки планшета системы RTCA iCELLigence, воздействовали полученными пептидными последовательностями в разных концентрациях. На рисунках 20 - 25 представлены результаты проведенных экспериментальных исследований, где показано, что разработанные последовательности по-разному проявляли антипролиферативную активность, при этом имелись зависимости как от структуры последовательности, так и от типа клеток, в отношении которых проводилось исследование.

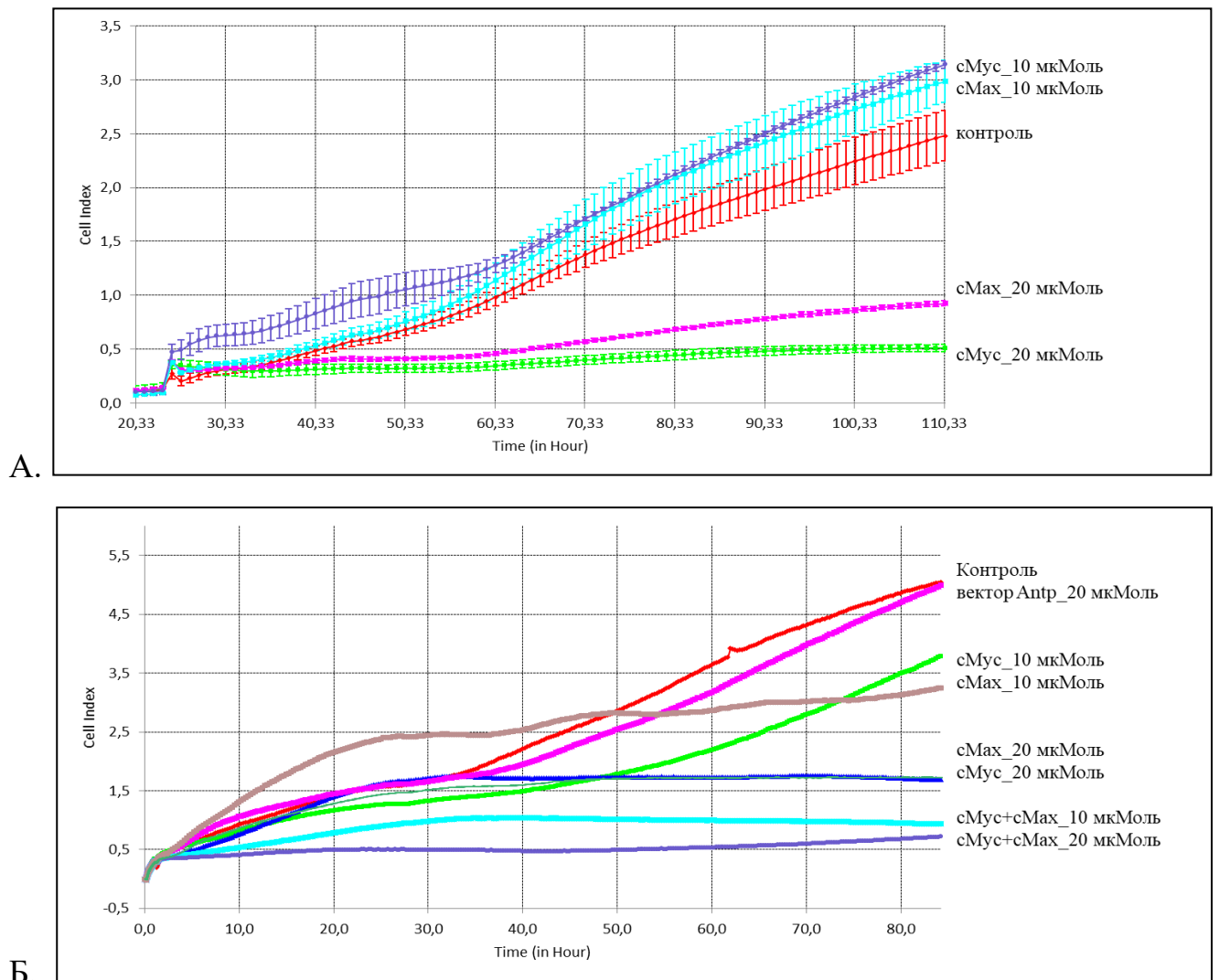


Рисунок 20 – Воздействие на пролиферативную активность клеток линии A549 (А) и HT29 (Б) пептидных ингибиторов транскрипционных факторов с-Мус и с-Мах

Ингибиторы транскрипционных факторов с-Myc и с-Max оказывали стойкий антипролиферативный эффект в концентрациях 20 мкМоль, однако при более низкой концентрации (10 мкМоль) эффект отсутствовал, как в случае с клетками A549, либо был обратимым - клетки линии HT29.

При анализе воздействия на клетки ингибиторов транскрипционных факторов с-Jun и с-Fos были установлены существенные отличия в зависимости от типа клеточной линии (Рисунок 21).

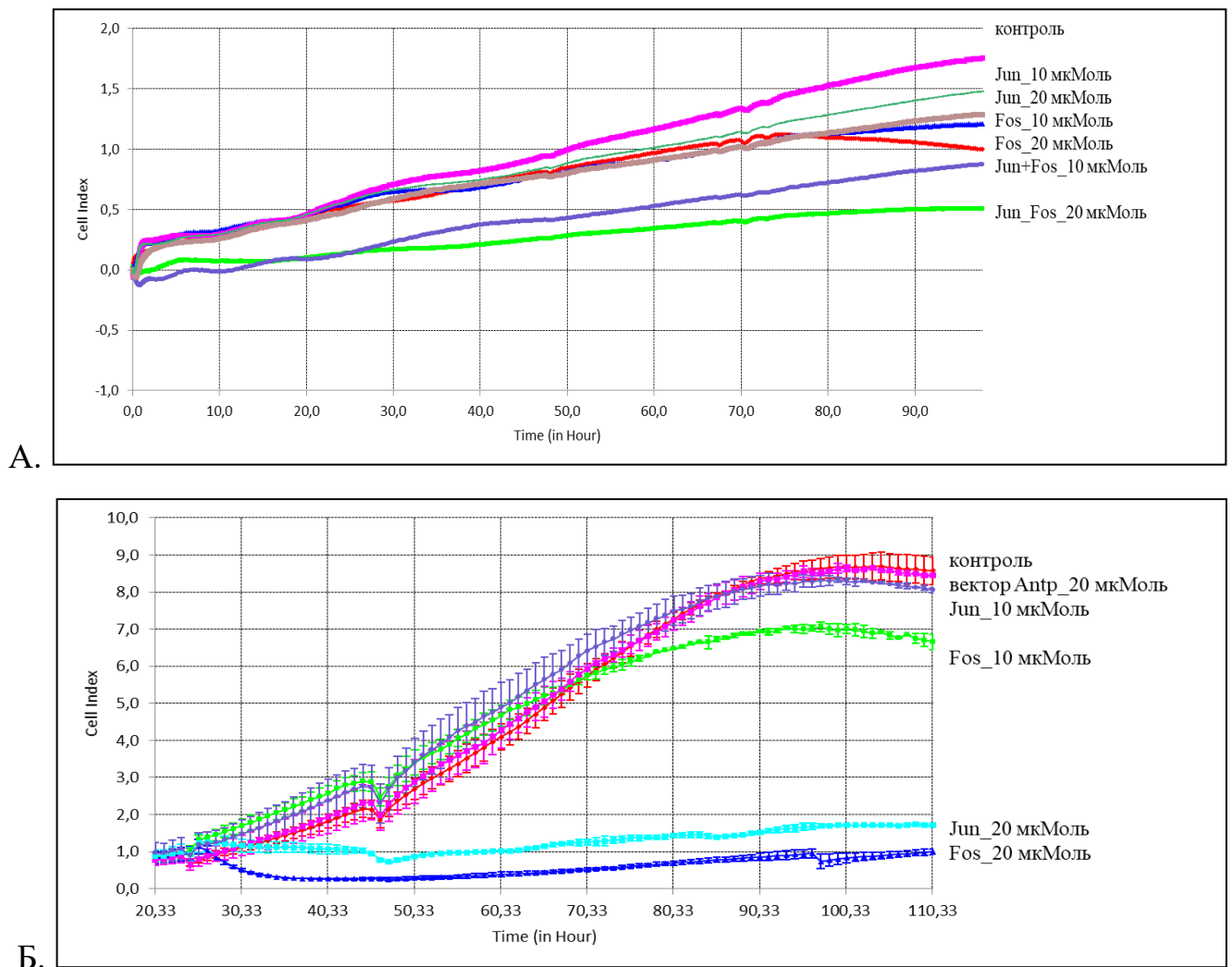


Рисунок 21 – Воздействие на пролиферативную активность клеток линии A549 (А) и HT29 (Б) пептидных ингибиторов транскрипционных факторов с-Jun и с-Fos

На клетки линии A549 (аденокарцинома легкого) данные последовательности оказывали минимальный антипролиферативный эффект, в то время как на клетки линии HT29 (аденокарцинома толстой кишки) при концентрации 20 мкМоль обе последовательности оказывали стойкий

антипролиферативный эффект, однако при меньших концентрациях эффекта не наблюдалось.

Высокую эффективность в качестве антипролиферативного агента показала последовательность, ингибирующая фактор транскрипции E2F. Для обеих исследуемых клеточных линий, при воздействии ингибитора E2F в концентрации 10 мкМоль, наблюдалось снижение роста культуры в два раза, а при воздействии в концентрации 20 мкМоль – полная остановка пролиферации (Рисунок 22).

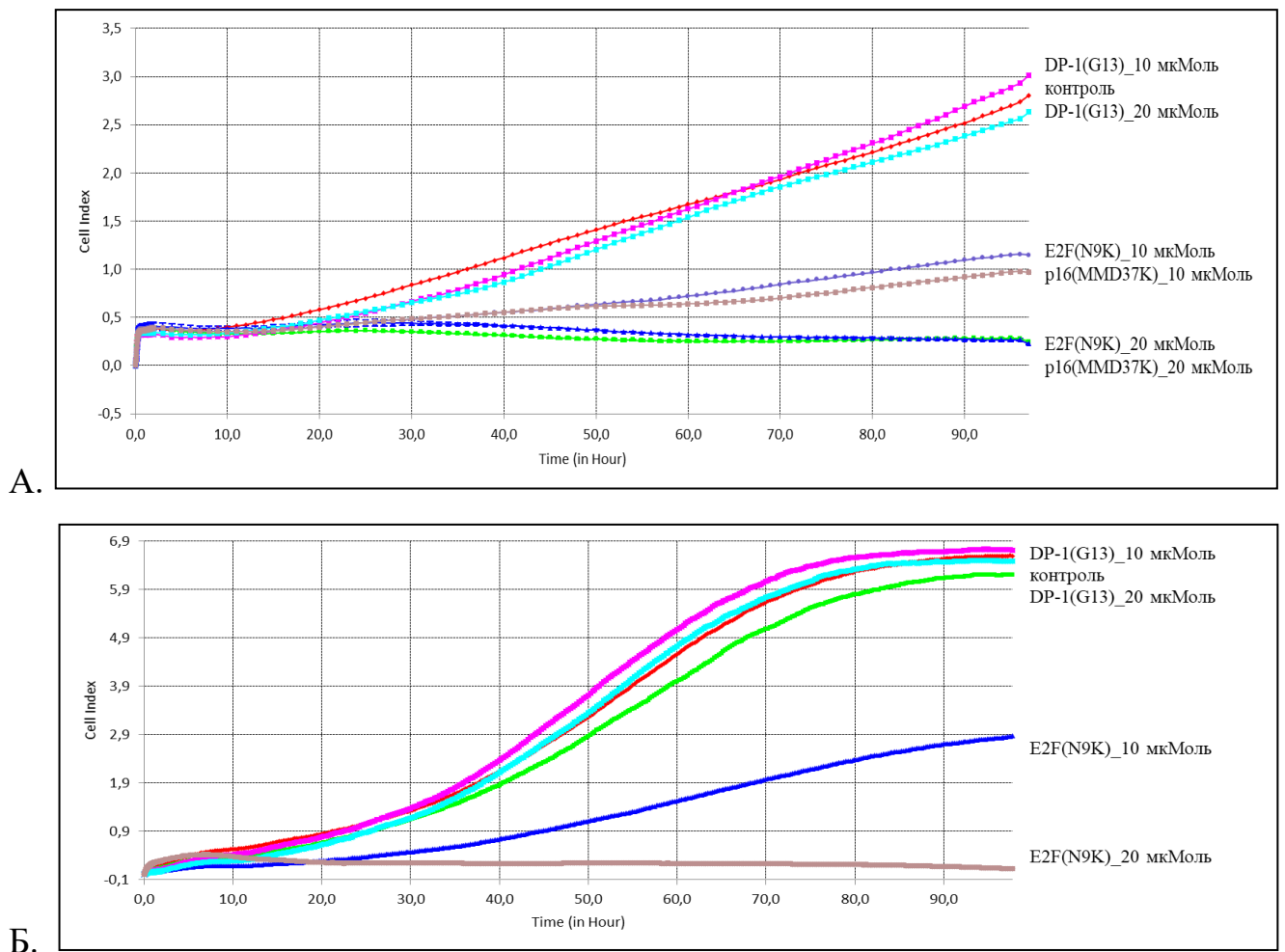


Рисунок 22 – Воздействие на пролиферативную активность клеток линии A549 (А) и HT29 (Б) пептидных ингибиторов факторов транскрипции E2F и DP-1 и последовательности ингибитора Cdk4/6 функционального фрагмента p16INK4a (А)

Аналогичный результат был зафиксирован для последовательности p16, являющейся модифицированным фрагментом естественного ингибитора пролиферации белка p16INK4a (рисунки 22А и 25Б). В то же время, пептид,

направленный на связывание с DP-1, не оказывал значимого воздействия на исследуемые клетки в концентрациях до 20 мкМоль.

Анализ результатов влияния на рост клеточных культур последовательностей, воздействующих на белки, ответственные за передачу митогенного импульса, Ras и Raf, показал отличия в степени влияния в зависимости от типа клеточной линии (Рисунок 23).

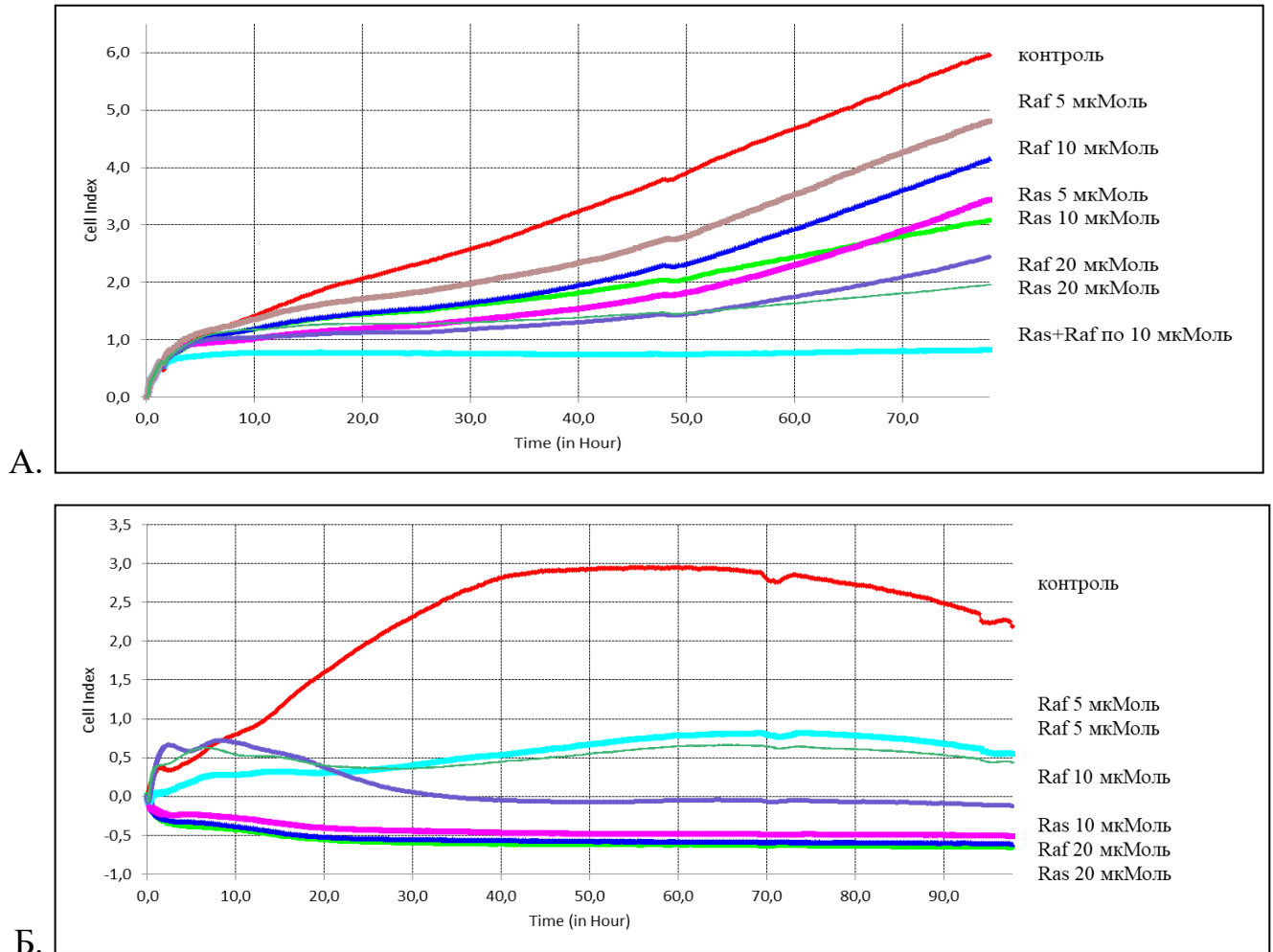
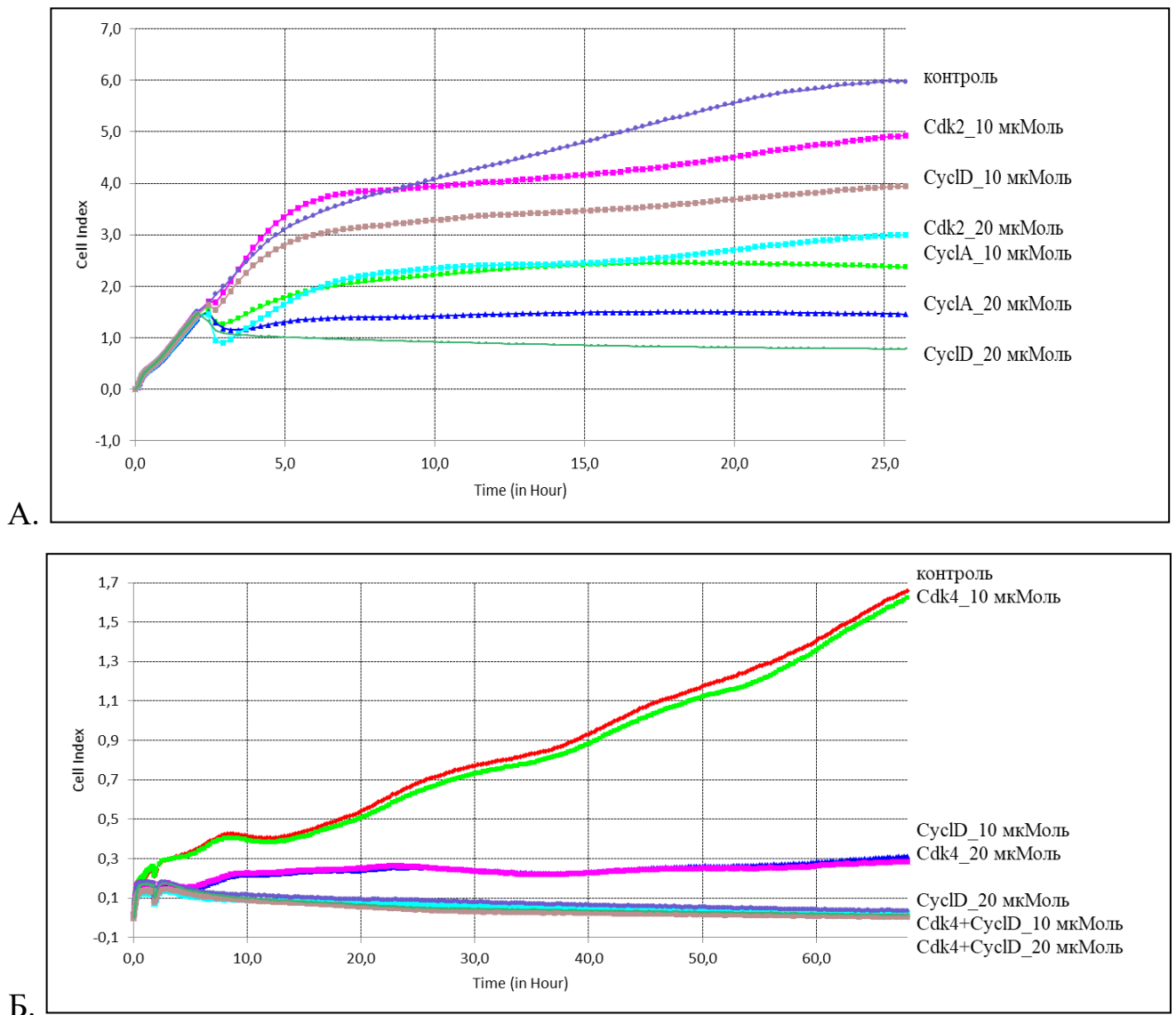


Рисунок 23 – Воздействие на пролиферативную активность клеток линии A549 (А) и HT29 (Б) пептидных ингибиторов белков Ras и Raf

При воздействии на клетки линии A549, последовательность Ras оказывала 50% торможения роста при концентрациях 5 и 10 мкМоль, последовательность Raf при данных концентрациях ингибировала рост клеточной популяции на 35%. При увеличении концентраций до 20 мкМоль, торможение роста клеток линии A549 составляло 67% для Raf и 72% для Ras. В отношении клеток линии HT29

последовательность ингибитор Ras оказывала стойкий антипролиферативный эффект при концентрации 10 мкМоль и более.

Пептидные последовательности, воздействующие на комплекс циклина/Cdk2, в меньшей степени обладали антипролиферативными свойствами, чем последовательности, направленные на ингибирование образования комплекса циклинD/Cdk4. Однако, активность пептидов, воздействующих на циклин D/Cdk4 имела зависимость от типа клеточной линии, в большей степени данные пептиды воздействовали на клетки линии A549 (Рисунок 24), но в меньшей степени на клетки HT29 (Рисунок 25). Высокую цитостатическую активность проявила последовательность функционального фрагмента p16INK4a (Рисунок 25Б).



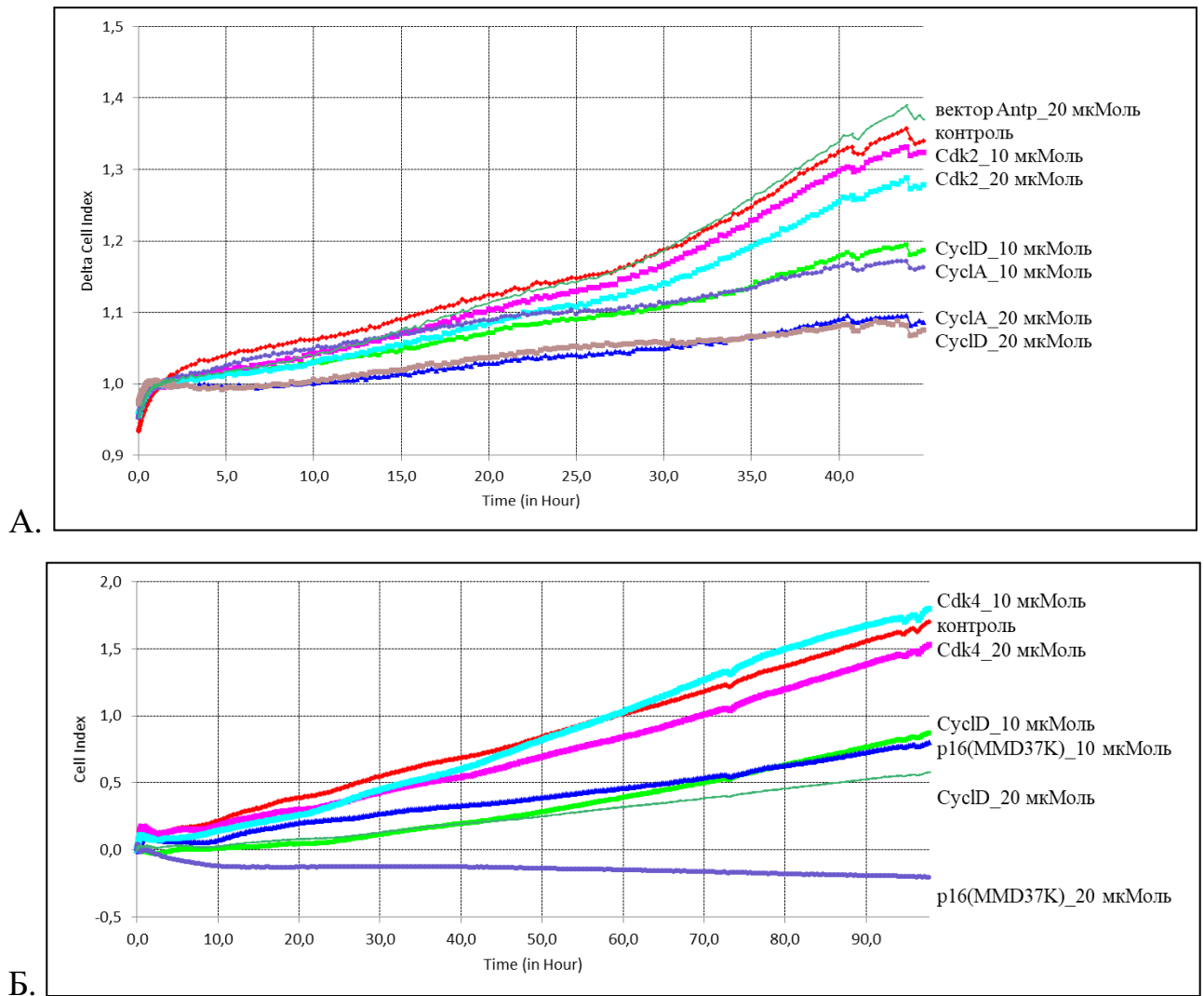


Рисунок 25 – Воздействие на пролиферативную активность клеток линии HT29 пептидных ингибиторов образования комплексов циклин D/Cdk4 (А, Б), циклин A/Cdk2(А) и последовательности ингибитора Cdk4/6 функционального фрагмента p16INK4a (Б)

Анализ проведенных экспериментальных исследований позволил выявить наиболее перспективные пептидные последовательности, обладающие выраженными антипролиферативными свойствами в отношении опухолевых клеток различных типов. Такими наиболее перспективными молекулами явились: ингибиторы Ras и E2F, а также последовательность p16.

Таким образом, проведенное обобщение полученных результатов и анализ литературных источников в отношении ингибиторов Ras, E2F, p16, показало, что на сегодняшний день, наибольшее число исследований направлено на разработку лекарственных противоопухолевых препаратов, воздействующих на белки

комплекса Ras-Raf [132, 165]. Причем, поиску пептидных ингибиторов, направленных на ингибирование Ras-ГТФазы уделяется особое значение поскольку малые молекулы, ингибирующие её АТФазную активность, обладают выраженной токсичностью. Пептиды рассматривают как более безопасную альтернативу для этой мишени [154, 262].

В результате, было принято решение, что дальнейший комплекс доклинических исследований будет проведен в отношении молекулы, являющейся пептидным ингибитором Ras-ГТФазы (K26K, Инг-Rac).

ГЛАВА 4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ – ПРЕПАРАТА ИНГ-РАС (результаты собственных исследований)

4.1 Исследование *in vitro* проникающей способности пептидных последовательностей методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии

В данной главе представлены результаты оценки проникающей способности пептидной последовательности, разработанной с помощью методов математического моделирования, являющейся ингибитором Ras-ГТФазы и включающей интернализуемый вектор (СРР). Из полученной базы потенциальных ингибиторов образования комплекса (Ras-Raf) была выбрана последовательность, обладающая способностью ингибировать взаимодействие Ras/Raf (Ras-Antrp-FITC) и проведен спектр исследований, позволяющих оценить способность к внутриклеточной интернализации и сравнить данную способность с последовательностью СРР – Antrp, не несущей функциональную часть.

Также в исследование была включена последовательность Ras-Ax-Antrp-FITC, отличающаяся от Ras-Antrp-FITC наличием линкерной вставки «Ax» между функциональной группой и СРР-вектором, которая, предположительно, может обеспечивать более легкое высвобождение функциональной группы Ras после внутриклеточного проникновения.

Последовательности, включающие флуоресцентную метку (FITC), были синтезированы методом твердофазного синтеза.

Исследования проводились в условиях *in vitro*, в качестве моделей были использованы культуры клеток линий A549 (аденокарцинома легкого человека), Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз, человек) и НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека), а также лейкоциты (моноклеарная фракция) периферической крови человека.

Исследование проводилось путем оценки внутриклеточного проникновения двух пептидных последовательностей, несущих флуоресцентную метку в

отношении клеток, с помощью методов: микроскопии, проточной цитофлуориметрии, флуоресцентной визуализации в реальном времени.

4.1.1 Исследование проникающей способности методом проточной цитофлуориметрии

Было показано, что при внесении и инкубации клеток со всеми исследуемыми пептидными последовательностями, наблюдается усиление флуоресценции, взаимодействие/проникновение пептидов в клетки. В отношении исследуемых опухолевых клеток не наблюдалось отличий по проникновению в зависимости от типа клеточной культуры, для мононуклеаров крови показаны характерные особенности, по-видимому, связанные с гетерогенностью полученной клеточной суспензии. Также зафиксированы отличия по интенсивности флуоресценции, амплитуды сдвига пика флуоресценции в зависимости от пептидной последовательности, что, возможно, отражает способность к интернализации.

Для контрольной последовательности Antp показано, что внесение данного СРР к культурам клеток приводит к усилению сигнала флуоресценции (Рисунок 26Б).

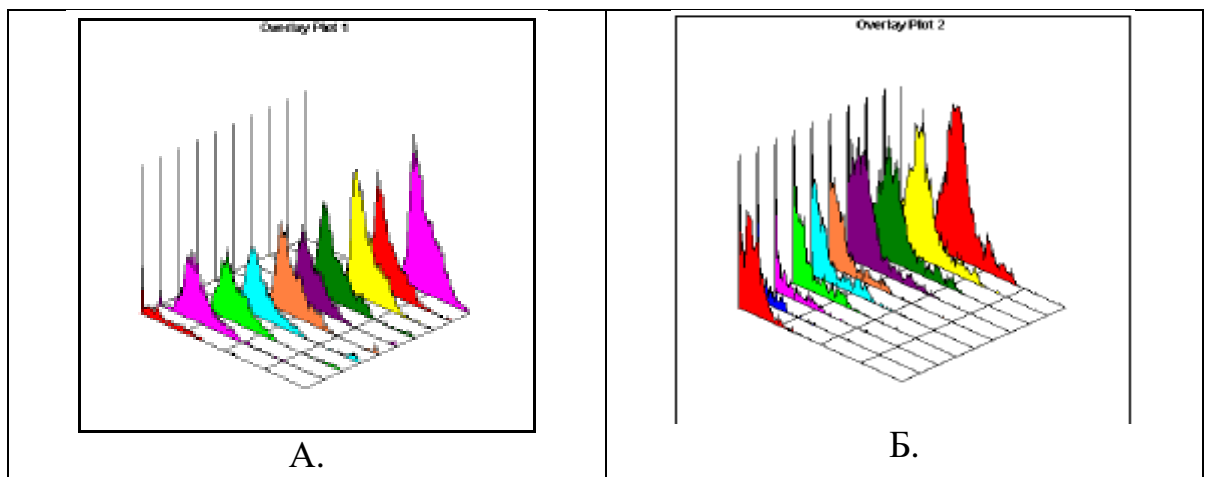


Рисунок 26 – Изменение положения пика Fl-1 при инкубации клеток A549 с последовательностями Ras-Antp-FITC (А) и Antp-FITC (Б) в концентрациях от 0 до 10 мкМ в течение 15 минут

Исследования были проведены для трех клеточных культур в трех повторах, где в отношении клеток линии НСТ116 показано, что наибольший сдвиг пика

флуоресценции вызывает внесение пептида Ras-Antp-FITC (Рисунок 27А). Последовательность Ras-Ax-Antp-FITC имеет эффективность проникновения сопоставимую с контрольной СРР – Antp. В диапазоне концентраций до 1,5 мкМоль интенсивность проникновения пептидных последовательностей имеет вид экспоненциальной кривой (Рисунок 27Б), при увеличении концентраций в диапазоне от 2 до 10 мкМоль зависимость проникновения линейна (Рисунок 27В).

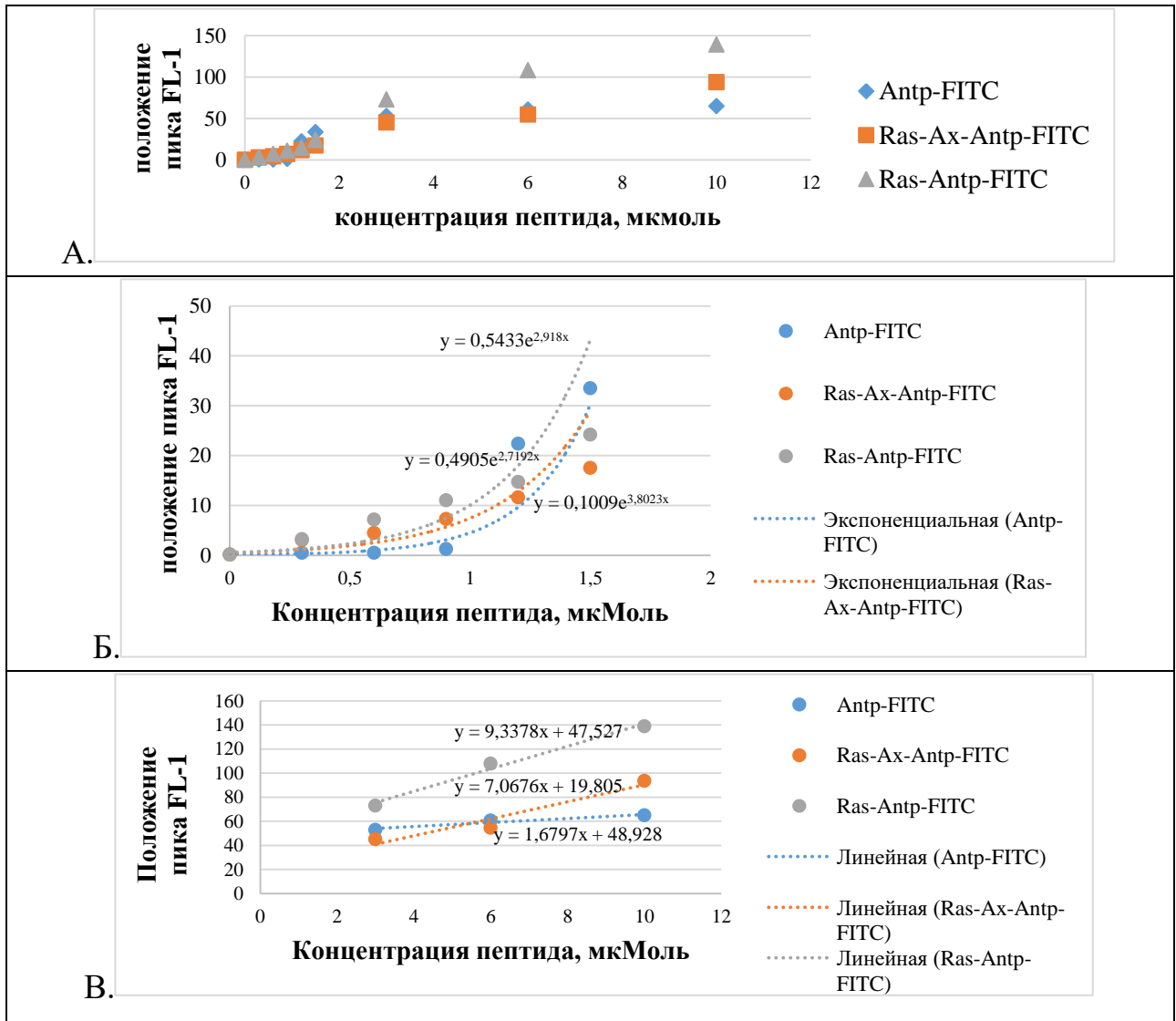


Рисунок 27 – Исследование проникающей способности пептидных последовательностей Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC, полученных методом математического моделирования, путем оценки изменения флуоресценции клеток при инкубации с пептидами в течение 15 минут

Примечание – исследование проведено методом проточной цитофлуориметрии на модели клеток линии НСТ116. Рисунок 27А – диапазон концентраций от 0 до 10 мкМоль; 27Б – диапазон концентраций от 0 до 1,5 мкМоль; 27В – диапазон концентраций от 2 до 10 мкМоль

Аналогичные результаты были получены при инкубации последовательностей с клетками A549 (Рисунок 28) и Jurkat (Рисунок 29).

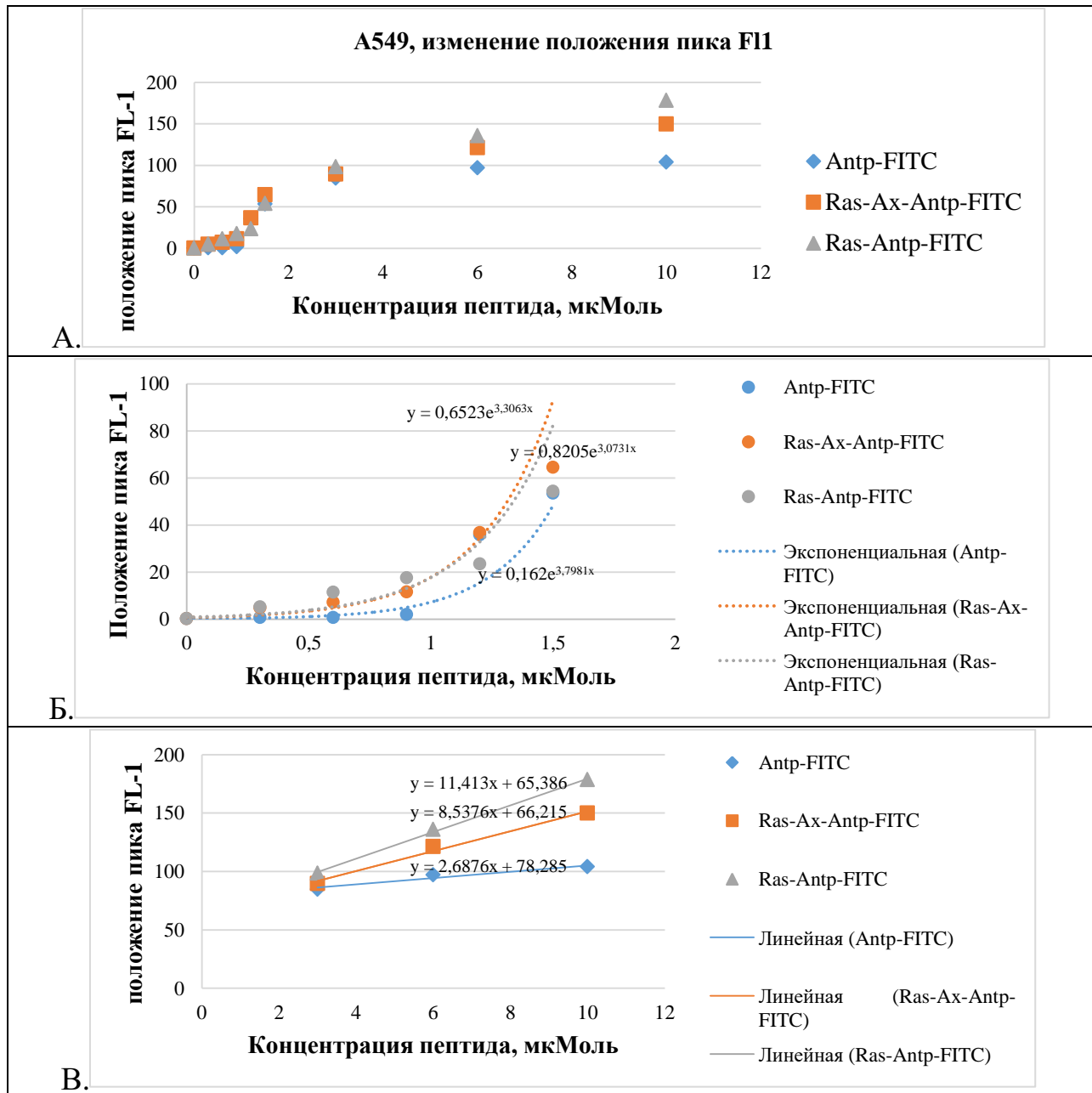


Рисунок 28 – Исследование проникающей способности пептидных последовательностей Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC, полученных методом математического моделирования, путем оценки изменения флуоресценции клеток при инкубации с пептидами в течение 15 минут

Примечание – исследование проведено методом проточной цитометрии на модели клеток линии A549. А – диапазон концентраций от 0 до 10 мкМоль; Б – диапазон концентраций от 0 до 1,5 мкМоль; В – диапазон концентраций от 2 до 10 мкМоль

Исследуемые последовательности ингибитора Ras-ГТФазы проникали в клетки, вызывая сдвиг пика флуоресценции в образцах, где наибольшая

эффективность проникновения показана для последовательности Ras-Antp-FITC. Последовательность Ras-Ax-Antp-FITC индуцировала «свечение» клеток, т.е. окрашивала, проникала внутрь клеток с эффективностью близкой к данным показателям контрольной последовательности – Antp-FITC при воздействии на клетки линий A549 и НСТ 116, однако, при взаимодействии с клетками Т-лимфобластного лейкоза Jurkat отмечено снижение проникающей способности последовательности Ras-Ax-Antp-FITC (Рисунок 29).

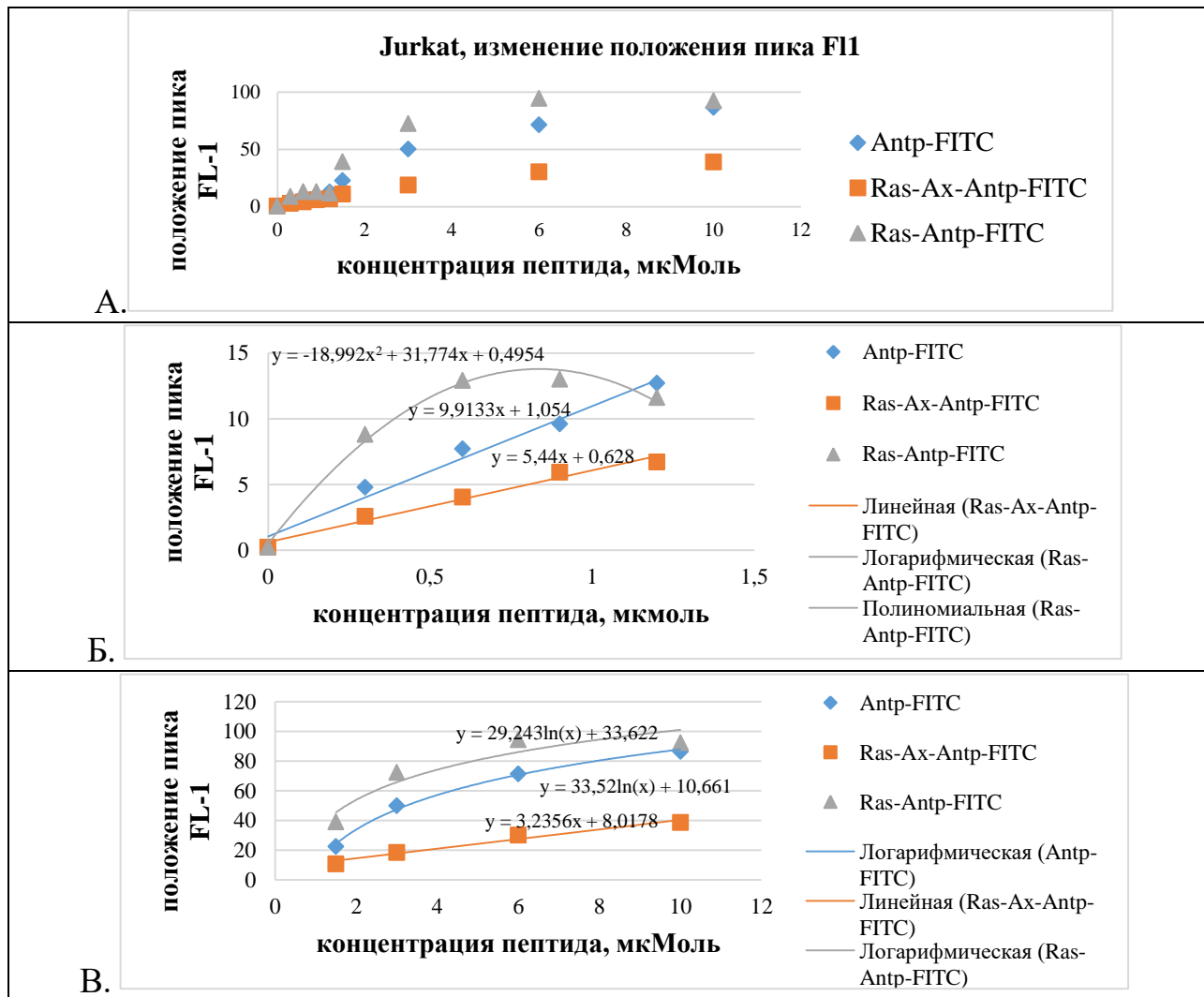


Рисунок 29 – Исследование проникающей способности пептидных последовательностей Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC, полученных методом математического моделирования, путем оценки изменения флуоресценции клеток при инкубации с пептидами в течение 15 минут

Примечание – исследование проведено методом проточной цитометрии на модели клеток линии Jurkat. А – диапазон концентраций от 0 до 10 мкМоль; Б – диапазон концентраций от 0 до 1,5 мкМоль; В – диапазон концентраций от 2 до 10 мкМоль

Анализ зависимостей проникающей способности пептидных последовательностей, являющихся ингибиторами Ras-ГТФазы, показал, что при малых концентрациях до 1,5 мкМ, форма кривой накопления пептида в клетках нелинейная для всех последовательностей в клетках НСТ116 и А549 и для последовательности Ras-Antp-FITC при взаимодействии с клетками Jurkat. Экспоненциальный тип концентрационной зависимости, полученный для НСТ116 и А549, может свидетельствовать о более медленном внутриклеточном накоплении в концентрациях до 1,5 мкМ и последующем быстром нарастании внутриклеточной концентрации, который отражает линейные зависимости, полученные на концентрациях более 2 мкМоль.

Исследование проникающей способности пептидных последовательностей также было проведено на клетках мононуклеарной фракции лейкоцитов крови здоровых доноров. Мононуклеары (РВМС) были получены путем наслаивания разведенной в 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) периферической крови на фикол ($\rho=1,077$), затем клетки отмывали в ФСБ, инкубировали с исследуемыми последовательностями и проводили измерение флуоресценции на проточном цитофлуориметре. Пептидные последовательности были взяты в тех же концентрациях - 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 3; 6 и 10 мкМ, инкубацию проводили в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Полученные значения положения пика флуоресценции F1-1, соответствующие детекции FITC для РВМС, были ниже, чем для клеток опухолевых культур. Для фракции РВМС было показано, что наибольшей эффективностью проникновения обладает последовательность Ras-Antp-FITC. Наиболее близкие значения к контрольной последовательности Antp-FITC принадлежат Ras-Ax-Antp-FITC, но и она превосходит по эффективности накопления молекулу CPP (Рисунок 30).

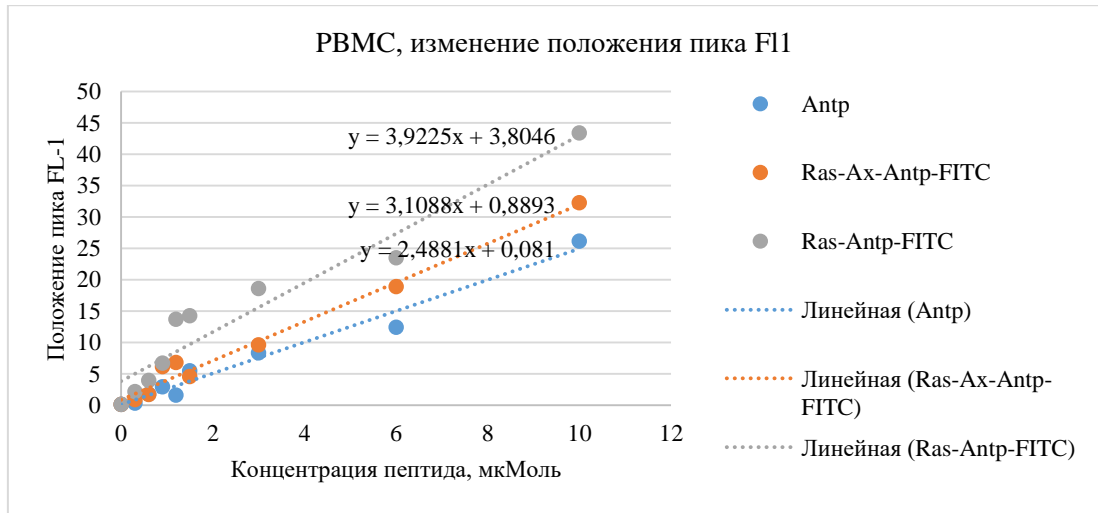
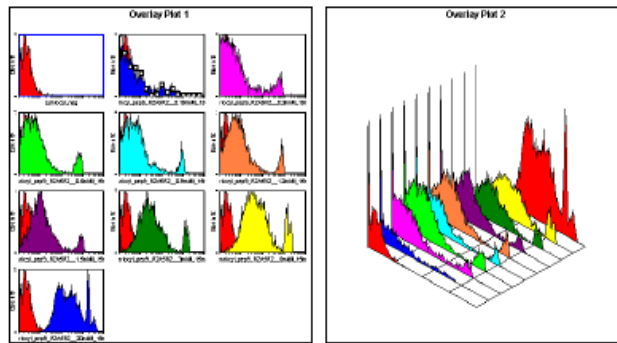


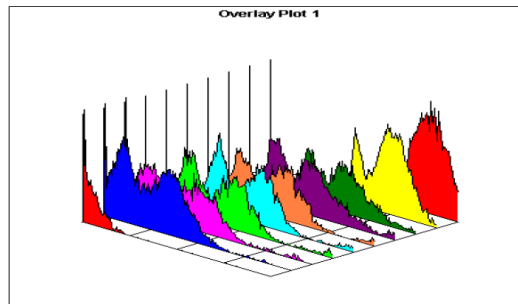
Рисунок 30 – Исследование проникающей способности пептидных последовательностей Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC, полученных методом математического моделирования, путем оценки изменения флуоресценции РВМС при инкубации с пептидами в течение 15 минут

Примечание – исследование проведено методом проточной цитометрии

При оценке проникающей способности последовательностей Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC в мононуклеары крови было обнаружено раздвоение пика флуоресценции (Рисунок 31) при взаимодействии всех исследуемых пептидных последовательностей с РВМС.



А.



Б.

Рисунок 31 – Форма пика FL-1 при проникновении последовательностей Antp (А) и Ras-Antp-FITC (Б) в мононуклеары периферической крови

Выделить определенную клеточную популяцию с «высокой» или «низкой» флуоресценцией не удалось, так как клетки не отличались по особенностям строения при микроскопии и при анализе параметров прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) при цитофлуориметрии равномерно распределялись между клеточными популяциями. При проведении анализа положения пика флуоресценции было предложено оценивать пик, включающий наибольшее количество клеток.

4.1.2 Исследование проникающей способности методом флуоресцентной микроскопии

С помощью флуоресцентной микроскопии на основе системы Thunder Leica, предоставленной компанией ООО «БиоЛайн», проводилась фото и видео съемка изображений большого формата с целью оценки проникающей способности пептидных последовательностей. На рисунке 32 представлены изображения проникновения исследуемых пептидных последовательностей в концентрации 5 мкМоль в клетки A549.

Показано, что исследуемые пептидные последовательности проникают внутрь клеток, эффективность проникновения зависит от типа пептидной последовательности. Также показано, что во всех случаях имеется популяция клеток, в которую исследуемые пептидные последовательности проникают и накапливаются с большей эффективностью.

Для более глубокого анализа проникающей способности было проведено исследование с использованием метода конфокальной микроскопии. Проводился анализ проникновения и накопления исследуемых последовательностей в клетках адгезивных культур A549 и НСТ 116.

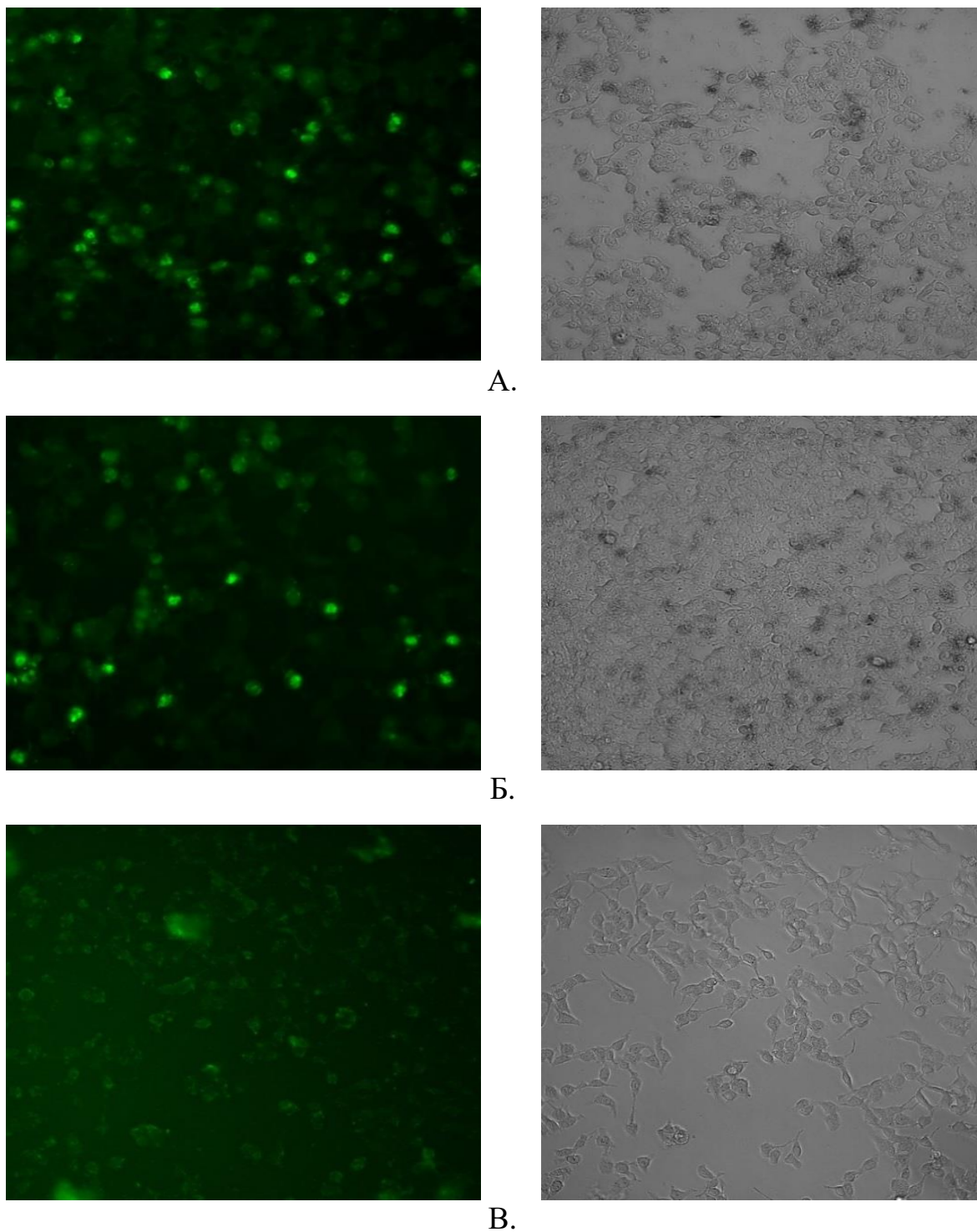


Рисунок 32 – Проникновение в клетки A549 последовательностей Antp-FITC (A) Ras-Antp-FITC (B) и Ras-Ax-Antp-FITC (B), анализ проведен с помощью системы визуализации Thunder Leica

На рисунке 33 представлены изображения клеток HCT116 после инкубации с последовательностями Antp-FITC, Ras-Antp-FITC и Ras-Ax-Antp-FITC в концентрации 5 мкМ, несущими флуоресцентную метку.

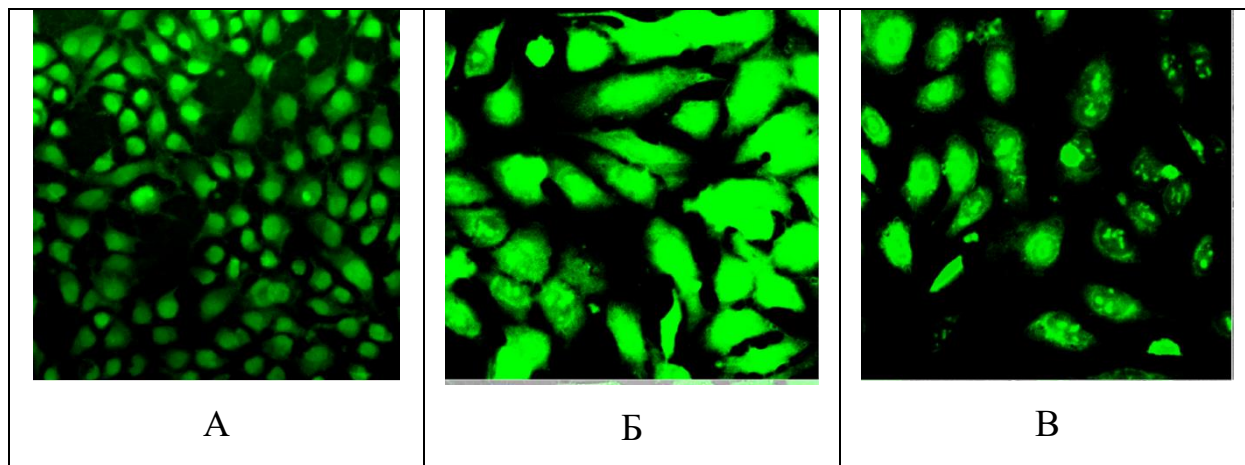


Рисунок 33 – Проникновение в клетки линии HCT116 интернализуемых последовательностей Antp-FITC (А) Ras-Antp-FITC (Б) и Ras-Ax-Antp-FITC (В)

Проведенное исследование свойств интернализации пептидных последовательностей, потенциальных ингибиторов Ras-ГТФазы, полученных с помощью методов математического моделирования, подтвердило, что данные последовательности обладают способностью к внутриклеточному проникновению. Микроскопия позволила определить, что преимущественно накопление исследуемых пептидов происходит в клеточном ядре.

Таким образом, разработанные пептидные конструкции характеризуются высокой скоростью проникновения в клетки, при этом эффективность и скорость их внутриклеточного накопления сопоставимы и в ряде случаев несколько превосходят соответствующие показатели контрольной последовательности СРР-Antp.

С учетом более высоких показателей проникающей способности, в дальнейшие исследования была выбрана последовательность Ras-Antp. В качестве лабораторного названия потенциального лекарственного препарата было выбрано «K26K», как описывающее структуру пептидной последовательности и в качестве возможного коммерческого названия – «Инг-Рас», как отражающее основное свойство, ингибирование Ras-ГТФазы.

4.2 Исследование специфической фармакологической активности *in vitro* лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы

Исследования влияния Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) на клеточные линии опухолей человека показало наличие выраженного антипролиферативного эффекта. Полное ингибирование пролиферации клеток наблюдалось независимо от мутационного статуса клеточной линии при концентрации пептидного препарата 20 мкМ. Исследования цитотоксичности выявило определенные зависимости от типа мутаций в системе Ras/Raf. Клеточные линии с мутацией гена BRAf и с диким типом гена Ras имели большую чувствительность к препарату по сравнению с клеточными линиями с мутантным геном Ras и без мутации BRAf или отсутствием мутаций в целевых генах. Исследования изменений экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации и апоптоза, доказали специфичность воздействия последовательности Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) на молекулярную мишень.

4.2.1 Проведение исследований *in vitro* по оценке противоопухолевой эффективности (антипролиферативный и цитотоксические эффекты) последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы

В отношении клеток линий рака легкого человека (A549, H460 и H1299) было показано, что последовательность обладает выраженным цитотоксическим действием, эффект пропорционален концентрации лекарственного средства, однако низкие концентрации 2 и 5 мкМ вызывают обратимый эффект, в то время как, концентрации более 10 мкМ оказывают стойкий цитотоксический эффект. Показано, что наибольший эффект наблюдался при инкубации Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) с клетками H1299, данная культура оказалась наиболее чувствительной к воздействию (Рисунок 34).

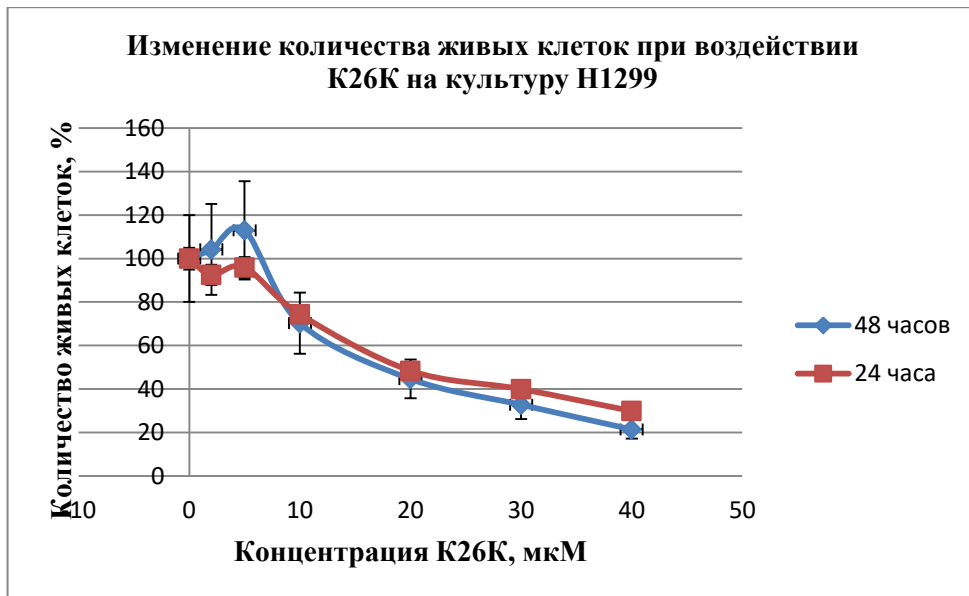


Рисунок 34 – Изменение количества живых клеток при воздействии на культуру H1299 последовательности K26K в различных концентрациях при инкубации 24 и 48 часов. Метод МТТ-тест

При исследовании влияния пептидной последовательности K26K на культуру клеток HT-29 установлено, что количество живых клеток уменьшается при увеличении концентрации препарата в диапазоне 5–40 мкМ через 24 ч инкубации. При концентрации 40 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до 51%. При инкубации 48 ч снижение жизнеспособности более чем на 50% наблюдалось уже при концентрации Ras-Antr (K26K, Инг-Ras) 5 мкМ. При исследовании цитотоксического влияния последовательности K26K на клетки линии OAW-42, также было показано, что снижение количества живых клеток происходит пропорционально увеличению концентрации K26K в диапазоне от 2 до 40 мкМ, однако, достоверное снижение количества живых клеток относительно контрольных образцов наблюдается при увеличении концентрации более 20 мкМ. При концентрации 40 мкМ происходит снижение количества живых клеток на 48%.

Схожие результаты изменения количества живых клеток были получены при исследовании воздействия последовательности K26K на культуру клеток OVCAR-3. Значимые снижения количества живых клеток наблюдались при

воздействии K26K в концентрациях более 30 мкМ, при увеличении времени воздействия до 48 часов, достоверного снижения количества живых клеток получено не было.

На основании проведенных исследований противоопухолевого эффекта лекарственного средства K26K методом МТТ было показано, что последовательность обладает выраженным цитотоксическим действием относительно исследуемой линии аденокарциномы толстой кишки HT-29, и в меньшей степени воздействует на линии рака яичника (OVCAR-3, OAW-42). Эффект пропорционален концентрации лекарственного средства, и увеличивается при более длительном времени воздействия, для HT-29 различия при инкубации 24 и 48 часов достоверны. На рисунке 35 показано сравнение цитотоксического эффекта последовательности K26K относительно трех исследуемых линий при инкубации 48 часов.

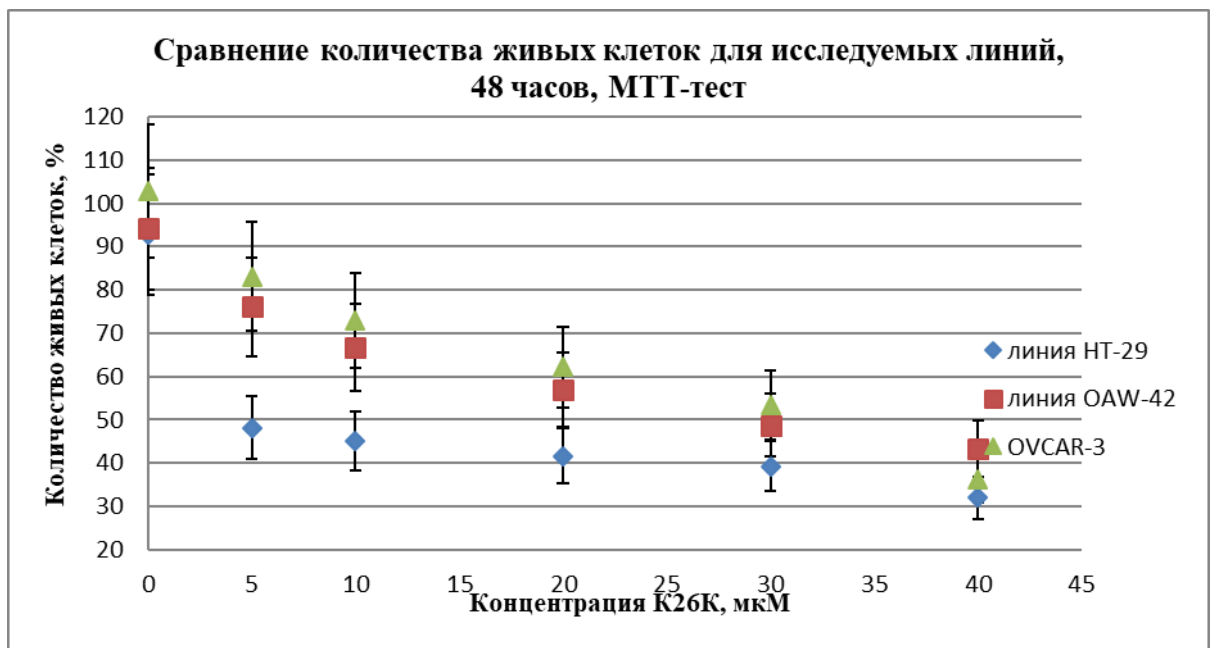


Рисунок 35 – Воздействие последовательности Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) на культуры клеток HT-29, OVCAR-3, OAW-42, время инкубации 48 часов

Исследование цитотоксичности пептидной последовательности ингибитора Ras-ГТФазы K26K с помощью ЛДГ-теста было поведено после 24-часовой и 48-часовой инкубации культур клеток с K26K в концентрациях 5, 10, 20 и 40 мкМ. Проведенная оценка результатов ЛДГ-теста для культур клеток HT-29, OVCAR-3,

ОАW-42 с пептидным ингибитором Ras-ГТФазы (K26K) показала наличие выраженного цитотоксического эффекта, эффект линейно зависит от концентрации внесенного в культуральную среду K26K и, в меньшей степени, зависит от времени инкубации. Уровень ЛДГ возрастает для всех исследованных культур пропорционально концентрации K26K и также увеличивается при времени инкубации 48 часов. Однако, как и при оценке воздействия с помощью МТТ-теста, эффект более выражен для культуры НТ-29 и в меньшей степени – для культур рака яичника, OVCAR-3, ОАW-42. Высота пика на рисунке 36 соответствует относительному уровню ЛДГ и пропорциональна количеству погибших клеток.

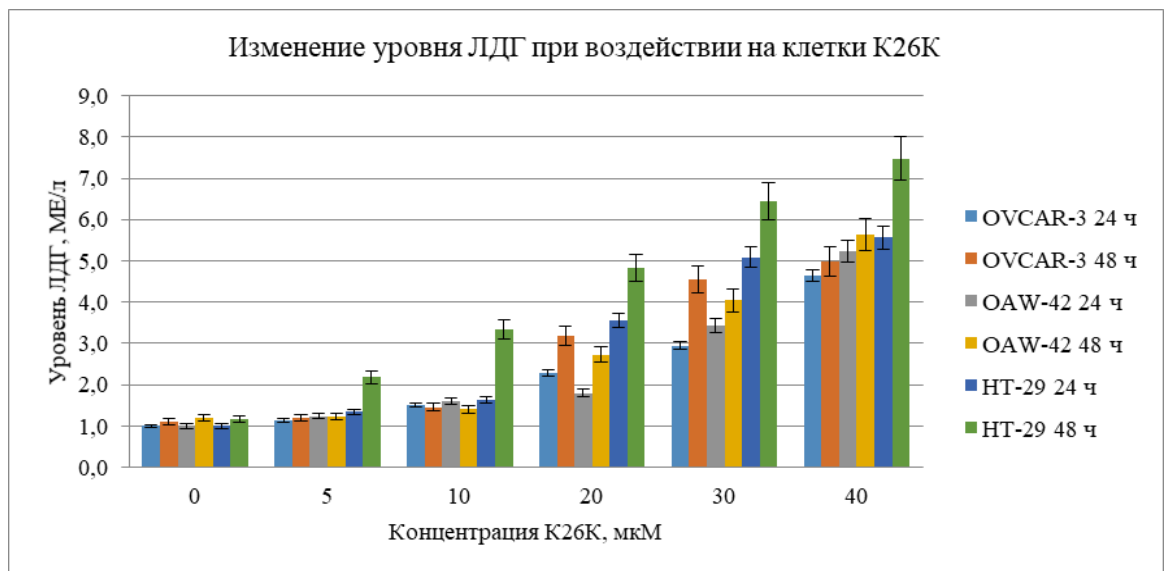


Рисунок 36 – Результаты ЛДГ-теста клеток культур НТ-29, OVCAR-3, ОАW-42 после 24 и 48 часов инкубации с пептидной последовательностью ингибитором Ras-ГТФазы – Инг-Рас, в концентрациях от 5 до 40 мкМ

Примечание – результаты контроля - клетки культур, инкубированные со средой, в течение 24 часов, приняты за 1

С помощью метода ЛДГ-теста было показано, что исследуемое лекарственное средство на основе пептидной последовательности ингибитора Ras-ГТФазы – K26K, способно воздействовать на клетки рака различной локализации, но, при сравнении эффектов, обладает более выраженным цитотоксическим эффектом относительно клеток аденокарциномы толстой кишки человека. Цитотоксический эффект пептидной последовательности K26K линейно зависит от её концентрации в культуральной среде и длительности инкубации.

При исследовании противоопухолевого эффекта последовательности K26K методом окраски CFDA-SE/PI было проведено сравнение эффектов K26K на культурах HT-29, OVCAR-3 и OAW-42. Оценка результатов проводилась через 24 часа инкубации клеток с пептидным ингибитором Ras-ГТФазы, при воздействии на клетки его различных концентраций (10, 20, 30 и 40 мкМ). Для каждой из исследуемых клеточных линий было проведено три последовательных идентичных эксперимента.

Было установлено, что при воздействии Ras-Antp (K26K, Инг-Rac), происходит увеличение количества мертвых клеток для трех исследуемых культур, однако, эффект максимален в культуре аденокарциномы толстой кишки – HT-29 (Рисунок 37).

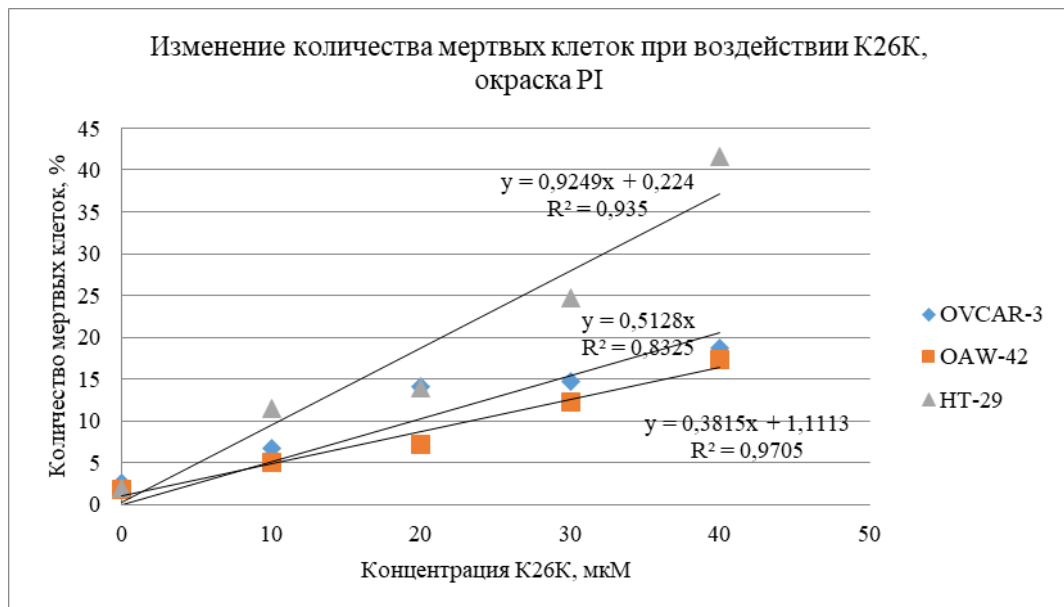


Рисунок 37 – Сравнение цитотоксического эффекта Инг-Rac относительно культур HT-29, OVCAR-3 и OAW-42

Примечание – Окраска CFDA-SE/PI, зависимость изменения количества PI-положительных частиц от концентрации ЛС, время инкубации 24 часа

Исследование проапоптотической и цитотоксической активности пептидной последовательности ингибитора Ras-ГТФазы – K26K было проведено с помощью метода проточной цитофлуориметрии окраской Annexin V/PI.

Оценка цитотоксического и проапоптотического эффектов проводилась для клеток культур HT-29, OVCAR-3 и OAW-42 при концентрациях K26K – 5, 10, 20, 30 и 40 мкМ; время инкубации составило 24 часа.

Было показано, что для исследуемых клеточных культур внесение последовательности K26K вызывает индукцию апоптоза. Уровень апоптоза зависит от концентрации K26K, как и уровень клеток, погибших по пути некроза. Для противоопухолевой терапии наиболее предпочтителен вариант гибели опухолевых клеток по пути апоптоза, т.к. не вызывает обширного воспаления и выхода в интерстициальное пространство продуктов клеточного распада и индукторов воспалительных реакций. Также наличие высокого уровня апоптоза косвенно свидетельствует о специфичности воздействия лекарственного средства K26K, представляющего собой ингибитор Ras-ГТФазы. На рисунке 38 представлено сравнение уровня апоптоза, индуцированного внесением в культуральную среду последовательности K26K; показано, что максимальный эффект наблюдается при воздействии на культуру клеток линии HT-29.

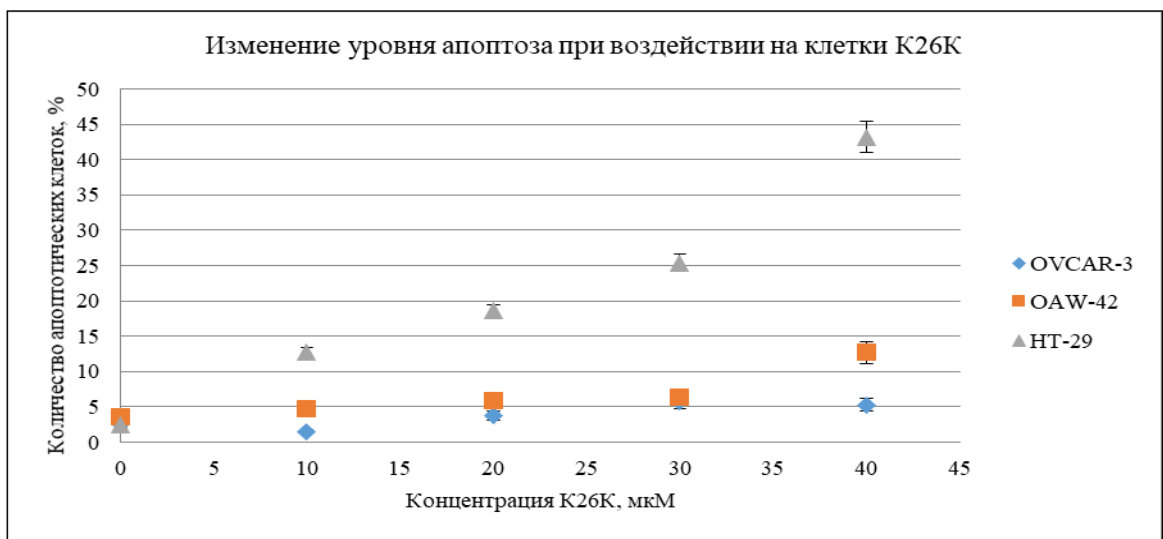


Рисунок 38 – Изменение уровня апоптоза и некроза в культуре клеток линий HT-29, OVCAR-3, OAW-42 при воздействии последовательности Инг-Рас в концентрациях 10 – 40 мкМ

Примечание – метод проточной цитофлуориметрии, окраска Annexin V-FITC (FL1) / PI (FL3)

Как видно из представленных результатов, зависимости уровней апоптоза и некроза для клеточных линий HT-29, OVCAR-3, OAW-42 при воздействии на них последовательности K26K, имеют большие различия. Уровень апоптоза при воздействии лекарственного средства K26K на культуру HT-29 достоверно возрастает по сравнению с контролем уже при концентрации K26K 10 мкМ, а при

концентрации 40 мкМ достигает 43,2%. В то время как, для культур OVCAR-3 и OAW-42 наблюдается больший процент гибели клеток по пути некроза.

Исследование уровней апоптоза и некроза для клеточных линий рака легкого при воздействии на них последовательности K26K, имеют схожий вид. Уровень апоптоза при воздействии лекарственного средства K26K в концентрации 40 мкМ и времени инкубации 24 часа возрастает до 35% в культуре A549 и до 40% в культуре H460, а уровни некроза до 32% и 31% соответственно. В то же время эффект воздействия последовательности K26K на клетки линии H1299 имеет принципиальные особенности, уровень индуцированного апоптоза в данной культуре был достоверно выше, чем уровень некроза. Количество клеток, вступивших в апоптоз (ранний + поздний апоптоз) при воздействии пептидной последовательности K26K в концентрации 10 мкМ составляло 27,7%, при увеличении концентрации до 20 мкМ – 38% и при концентрации 40 мкМ составило 45%.

Проведенное исследование видов клеточной гибели (апоптоз и некроз) при воздействии на клетки линий рака легкого человека методом проточной цитофлуориметрии с использованием двойной окраски Annexin V-FITC / PI, показало, что лекарственное средство K26K, представляющее собой пептидную последовательность ингибитора Ras-ГТФазы, обладает выраженным специфическим противоопухолевым действием в отношении культур клеток аденокарциномы толстой кишки и рака легкого человека. Данный эффект характеризуется индукцией клеточной гибели преимущественно по пути апоптоза. Уровень апоптоза, индуцированного внесением K26K в культуральную среду, зависит от типа клеток и определяется, по-видимому, молекулярно-генетическими особенностями клеточной линии. Клетки линий рака яичника оказались менее чувствительны к воздействию пептидного ингибитора Ras-ГТФазы – K26K.

Для динамического исследования влияния пептидного ингибитора Ras-ГТФазы – K26K на рост клеток культур клеточных линий HT-29, OVCAR-3, OAW-42 использовали прибор RTCA iCELLigence, фирмы ACEA Biosciences

(США). Для каждой клеточной линии была поставлена серия экспериментов по исследованию влияния K26K в диапазоне концентраций 10–40 мкМ. При проведении экспериментов клетки вносились на планшет в количестве 20 000 на лунку, инкубировались 3 часа для начального закрепления на дне планшета, а затем к культуральной среде добавлялось исследуемое вещество в различных концентрациях.

При исследовании цитостатического эффекта лекарственного средства K26K в отношении клеток линии HT-29, было показано, что при концентрации 10 мкМ наблюдается задержка пролиферации, клеточный индекс снижается в 1,5 раза. При концентрациях пептидного ингибитора Ras-ГТФазы более 20 мкМ наблюдается полная остановка клеточного деления, т.е. стойкий цитостатический эффект.

Для культуры OVCAR-3 (аденокарцинома яичника), показано, что эффект задержки пролиферации имеет концентрационную зависимость, однако, эффект обратим, и через 70 часов инкубации наблюдается полное восстановление пролиферативной активности клеток с концентрацией K26K 10 и 20 мкМ.

Изменения пролиферативной активности клеток культуры OAW-42 наблюдались при концентрациях K26K более 20 мкМ и определялись как полная и необратимая остановка клеточного роста, однако, при малых концентрациях (10 мкМ и менее) наблюдалось незначительное усиление пролиферативной активности клеток линии OAW-42.

Таким образом, при исследовании противоопухолевого эффекта последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы – K26K в отношении культур рака толстой кишки человека – HT-29 рака яичника - OAW-42 и OVCAR-3 было показано, что исследуемое лекарственное средство является потенциальным противоопухолевым препаратом, воздействующим на клетки опухолей различной локализации. Обладает выраженной цитотоксической активностью, определяющейся в увеличении количества мертвых клеток и снижении количества живых клеток в культурах исследуемых линий. Исследуемое лекарственное средство индуцирует апоптоз в опухолевых клетках

человека, причем, данный эффект зависит от типа клеточной линии. Цитотоксический и проапоптотический эффекты имеют прямую концентрационную зависимость. Цитостатический эффект Ras-Antp (K26K, Инг-Рас), определяющийся в снижении пролиферативной активности клеток при внесении K26K в культуральную среду, также имеет концентрационную зависимость и различен для разного типа клеток. Было установлено, что более сильная противоопухолевая активность наблюдается в отношении клеток аденокарциномы толстой кишки человека, а специфическая активность менее выражена в отношении клеток рака яичника.

4.2.2 Изучение молекулярных механизмов противоопухолевого действия ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) *in vitro* на моделях перевивных культур опухолей человека

Было проведено несколько серий экспериментов по изучению изменений экспрессионных профилей комплекса из 21 гена, контролирующих пролиферацию и апоптоз и опосредующих передачу сигнала по RAS-зависимому пути активации пролиферации. Исследования выполнены на клетках перевивных опухолевых культур рака легкого (A549) и двух линий клеток рака толстой кишки человека (HT29 и HCT116) под воздействием пептидной последовательности K26K — ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас). Определены гены, изменения которых характеризуют влияние данных пептидных последовательностей на процессы пролиферации и апоптоза.

Показано, что пептидная последовательность K26K эффективно ингибирует экспрессию генов, являющихся непосредственными мишенями RAS-зависимого пути пролиферации (транскрипционного фактора MYC и фактора пролиферации Cyclin D1). Эти гены активируются сигналами от рецепторов пролиферации, таких как EGFR, и ответственны за процессы клеточной пролиферации. Эффекты практически не зависели от исследованных клеточных линий; однако имелись отличия в воздействии на гены, регулирующие процессы апоптоза.

Для линии A549 (аденокарцинома легкого, наличие мутации KRAS с.34G>A p.G12S) показано, что внесение K26K (RAS-Antp) вызывает ингибирование генов, ответственных за активацию процессов пролиферации *c-MYC*, *CCND1*, *PTEN*, *Ki-67* в культуре активно пролиферирующих клеток (Рисунки 39-42).

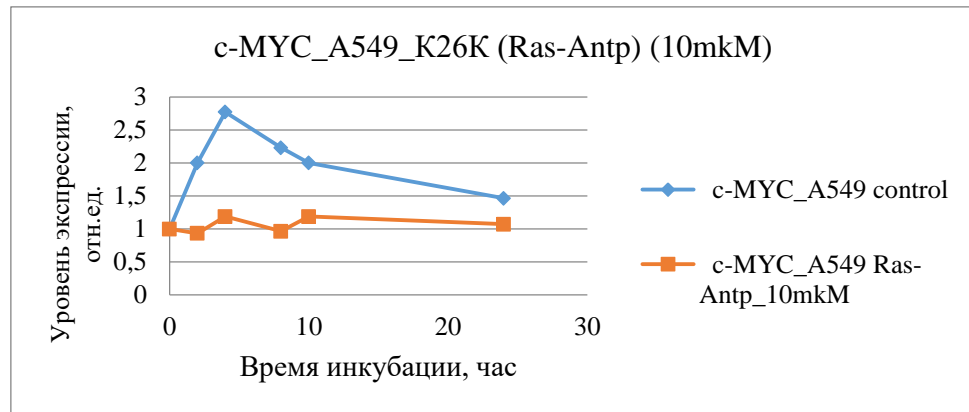


Рисунок 39 – Изменение экспрессии гена *c-MYC* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10мкМ

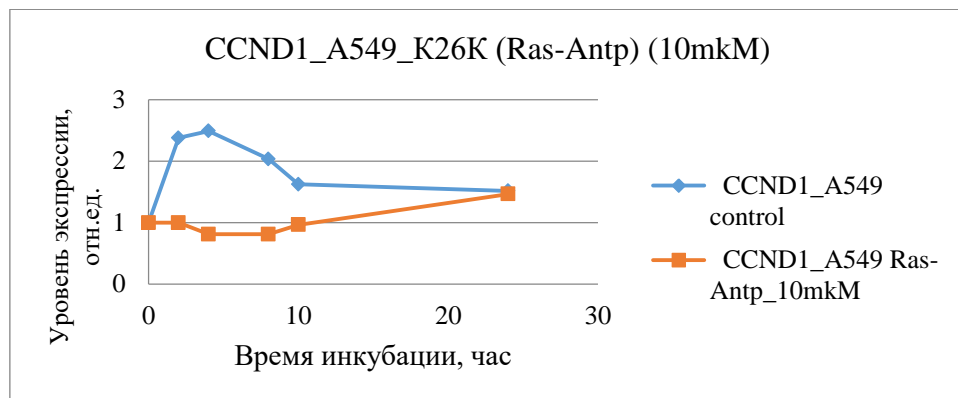


Рисунок 40 – Изменение экспрессии гена *CCND1* (циклин D1) при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10мкМ

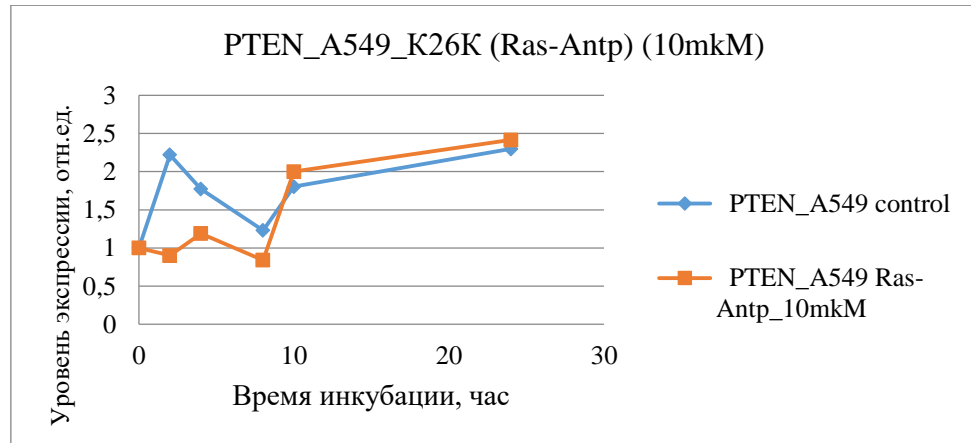


Рисунок 41 – Изменение экспрессии гена *PTEN* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10μM

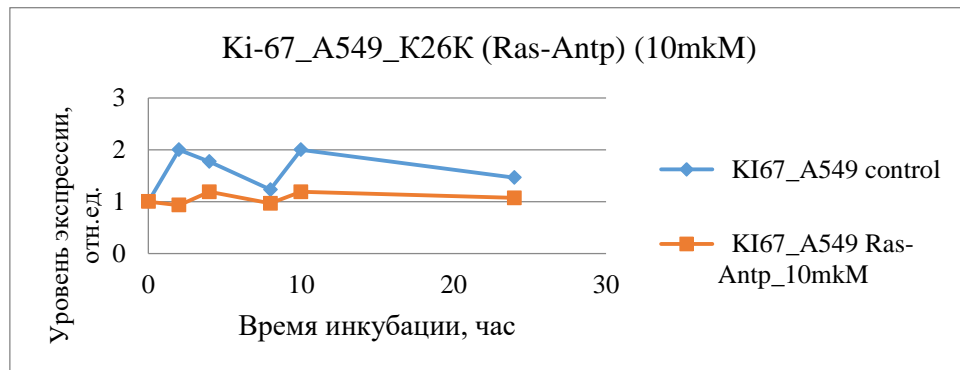


Рисунок 42 – Изменение экспрессии гена *Ki-67* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10μM

Снижение уровня экспрессии генов *c-MYC*, *CCND1*, *PTEN* показывает специфичность воздействия исследуемой последовательности ингибитора Ras-ГТФазы на целевую мишень – комплекс Ras-Raf и отражает ингибирование активации нижележащих точек сигнального пути Ras-ERK (MAPK/ERK).

При воздействии RAS-Antp на клетки A549 также показано ингибирование антиапоптотических генов *BCL2* и *BAG1*, *BIRC5* (Рисунки 43-45).

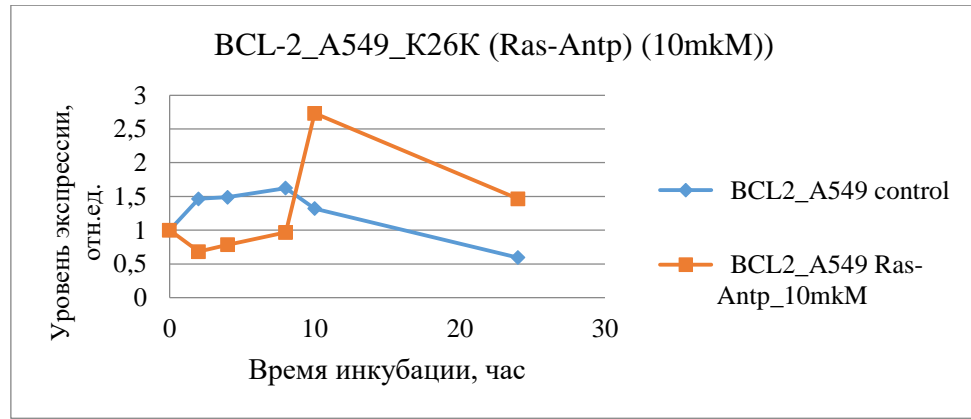


Рисунок 43 – Изменение экспрессии гена *BCL-2* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10μкМ

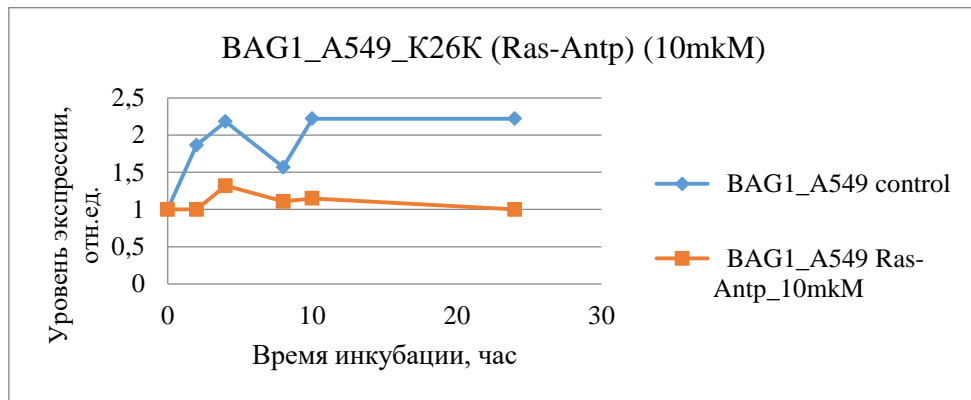


Рисунок 44 – Изменение экспрессии гена *BAG-1* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10μкМ

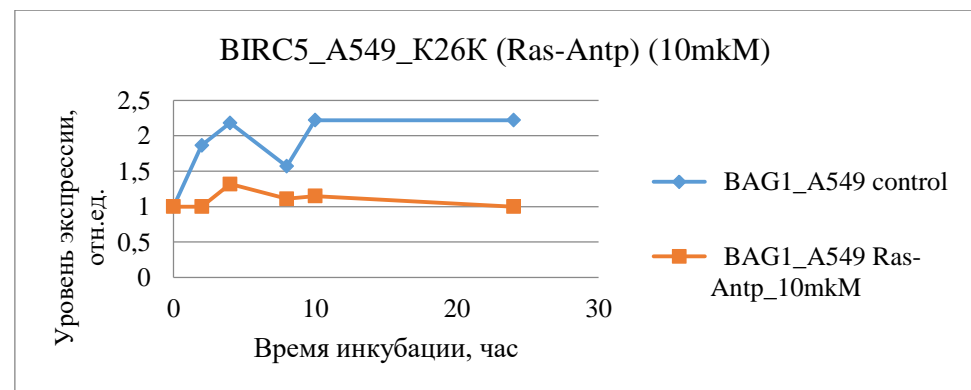


Рисунок 45 – Изменение экспрессии гена *BIRC5* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10μкМ

Увеличение экспрессии индуктора апоптоза – гена *BAX* (Bcl-2-ассоциированный белок) (Рисунок 46).

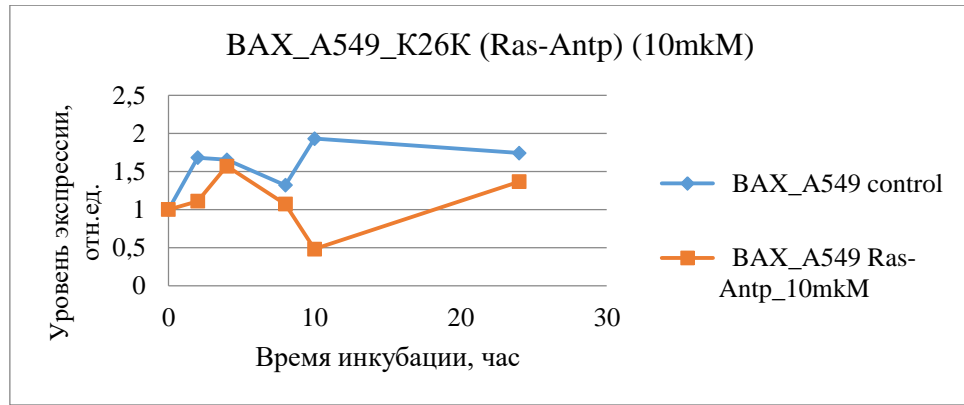


Рисунок 46 – Изменение экспрессии гена *BAX* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10мкМ

Снижение экспрессии гена *NDRG1* (Рисунок 47).

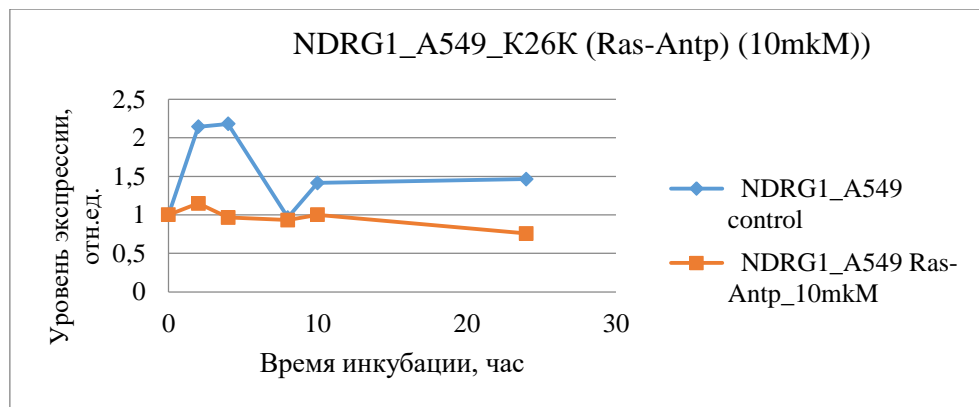


Рисунок 47 – Изменение экспрессии гена *NDRG1* при воздействии на клетки линии A549 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10мкМ

Для линии HCT116 (аденокарцинома толстой кишки, мутация KRAS G13D) получены следующие результаты для генов, ответственных за процессы пролиферации и отражающих специфичность воздействия исследуемой пептидной последовательности K26K (Ras-Antp) (ингибитор Ras-ГТФазы), при воздействии на клетки линии HCT116, где выявлено снижение экспрессии генов *c-MYC*, *CCND1* (Рисунки 48, 49). Отмечена задержка возрастания экспрессии данных генов на 8-10 часов.

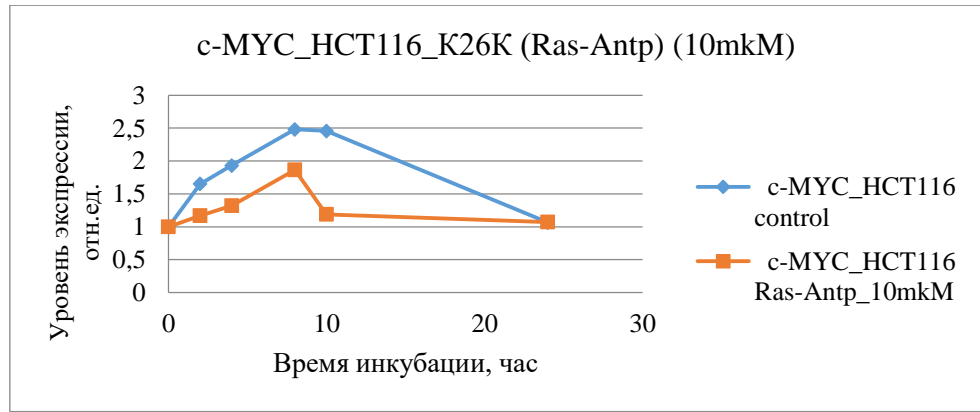


Рисунок 48 – Изменение экспрессии гена *c-MYC* при воздействии на клетки линии HCT116 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10 мкМ

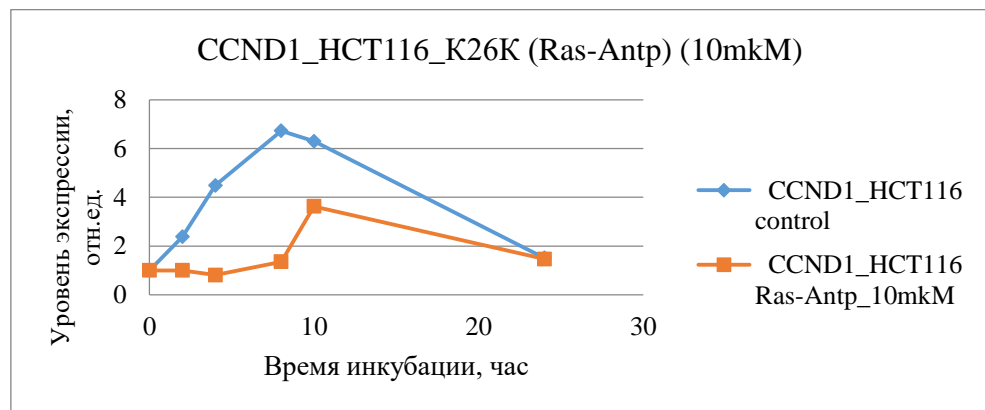


Рисунок 49 – Изменение экспрессии гена *CCND1* (циклин D) при воздействии на клетки линии HCT116 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10 мкМ

Для гена *PTEN*, ответственного за процессы пролиферации, но являющегося одним из ключевых регуляторов альтернативного пути пролиферации PI3K-РКВ/Акт, показано увеличение экспрессии (Рисунок 50), что, возможно, объясняется включением других механизмов регуляции клеточного цикла при остановке/ингибировании пути Ras-МАРК/ERK.

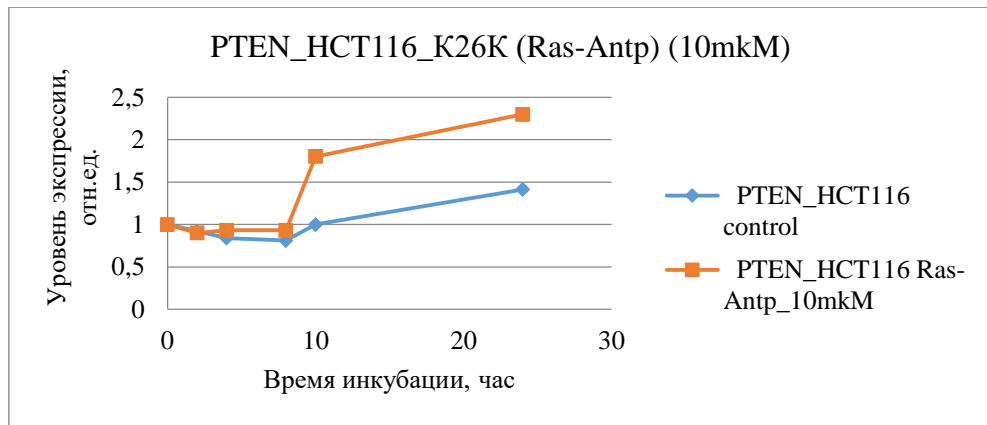


Рисунок 50 – Изменение экспрессии гена *PTEN* при воздействии на клетки линии НСТ116 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10мкМ

При исследовании изменений экспрессии гена *NDRG1* было зафиксировано, что его уровень экспрессии отличен от клеток линии A549, в контрольных образцах и в опытных, при внесении Ras-Antp, наблюдалось снижение экспрессии в интервале 4-8 часов с последующим возрастанием и более низким уровнем в опытных образцах. Также для линии НСТ116 не обнаружены достоверные отличия в уровне экспрессии генов *Ki-67* и *STK15* при воздействии пептидной последовательности K26K (Ras-Antp).

Для генов, ответственных за процессы апоптоза, отмечено увеличение экспрессии *BCL2* (Рисунок 51), увеличение экспрессии гена *BAX* (Рисунок 52). Хотя ген *BCL2*, обычно, принято считать ингибитором апоптоза, его увеличение можно рассматривать как ответный механизм на увеличенную клеточную гибель, спровоцированную внесением пептида Ras-Antp. Увеличение активатора апоптоза *BAX* отражает цитотоксическую активность исследуемого пептида Ras-Antp, способность индуцировать процессы апоптоза при внесении его к клеткам.

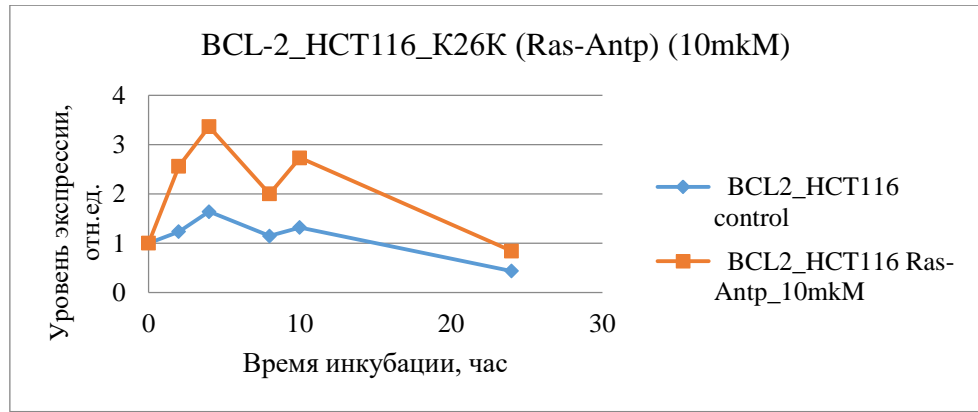


Рисунок 51 – Изменение экспрессии гена *BCL2* при воздействии на клетки линии НСТ116 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10 мкМ

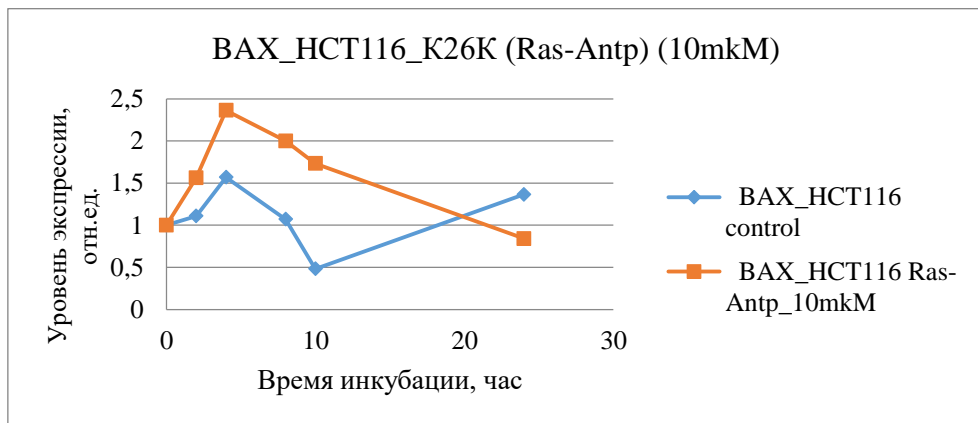


Рисунок 52 – Изменение экспрессии гена *BAX* при воздействии на клетки линии НСТ116 пептидной последовательности Ras-Antp (ингибитор Ras-ГТФазы) в концентрации 10 мкМ

Данные изменения экспрессии доказывают специфичность воздействия пептидной последовательности Ras-Antp на молекулярную мишень и показывают, что при внесении пептида к клеткам нарушаются процессы пролиферации «стоящие ниже» целевой мишени пептида – комплекса Ras-Raf.

При оценке результатов изменения экспрессии генов в клетках линии HT29 (мутация BRAF V600E) при воздействии пептидной последовательности K26K (RAS-Antp) в концентрации 10 мкМ было отмечено ингибирование экспрессии Циклина D в интервале до 8 часов после снятия блока синхронизации (Рисунок 53).

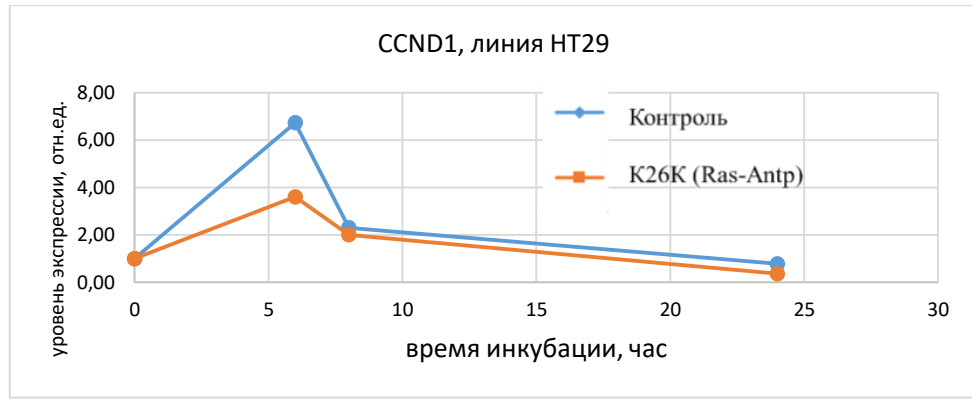


Рисунок 53 – Изменение экспрессии гена *CCND1* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности K26K (RAS-Antp)

Также это приводило к снижению экспрессии Циклина В и незначительному снижению *STK15* и *Ki67* после 10 часов инкубации. Снижение экспрессии гена *Ki67* показано на рисунке 54.

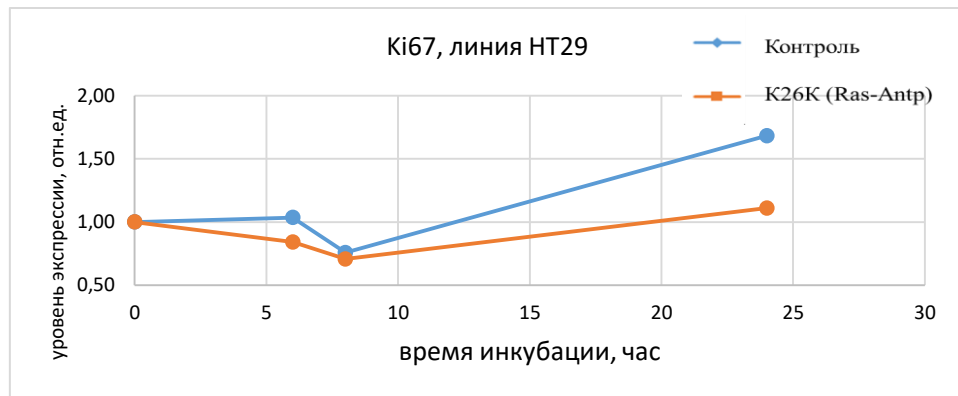


Рисунок 54 – Изменение экспрессии гена *Ki67* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности RAS-Antp

В интервале до 8 часов наблюдалось снижение экспрессии *HER2new* (Рисунок 55).

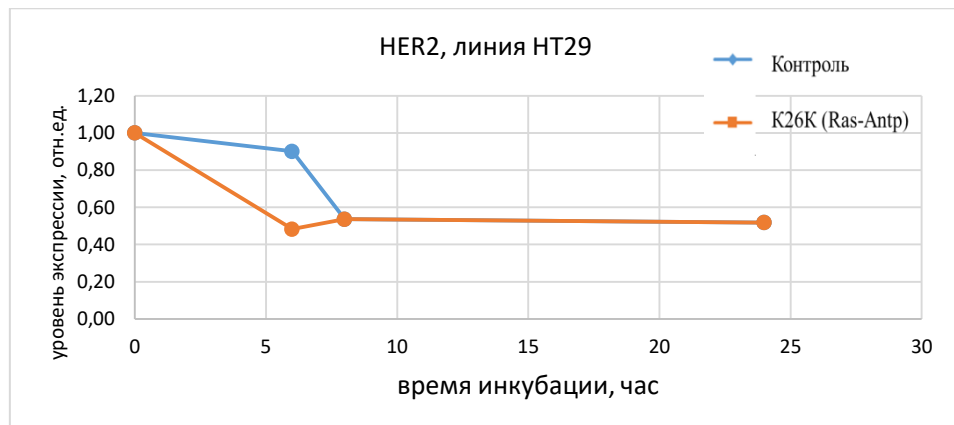


Рисунок 55 – Изменение экспрессии гена *HER2new* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности K26K (RAS-Antp)

Значимое ингибирование активности *TERT* (Рисунок 56), а также незначительное ингибирование транскрипционных факторов MYC и MYBL2.

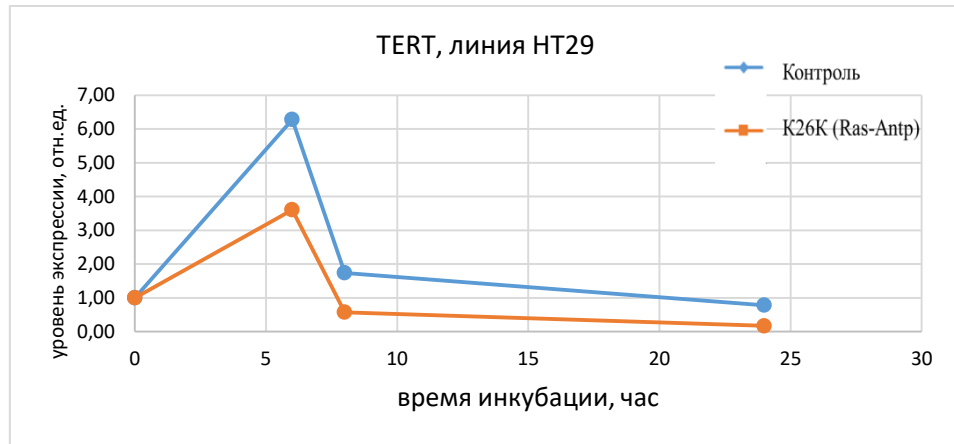


Рисунок 56 – Изменение экспрессии гена *TERT* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности K26K (RAS-Antp)

Показано снижение экспрессии генов-регуляторов апоптоза – *BCL2* (Рисунок 57), *BAG1* (Рисунок 58).

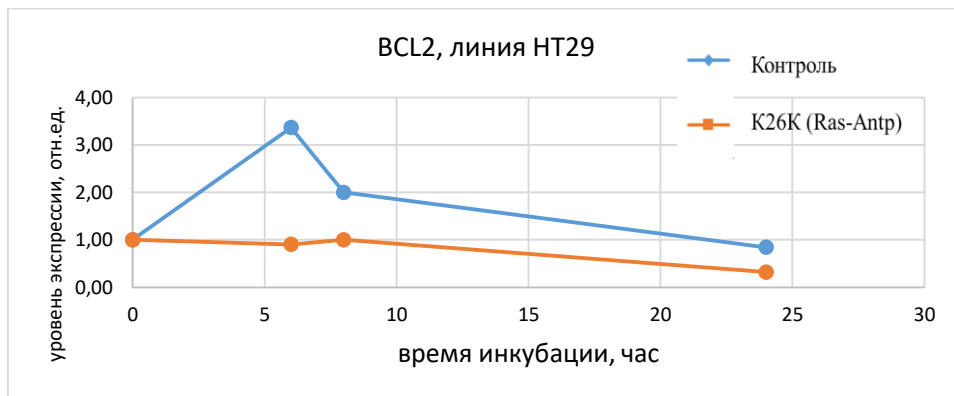


Рисунок 57 – Изменение экспрессии гена *BCL2* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности RAS-Antp

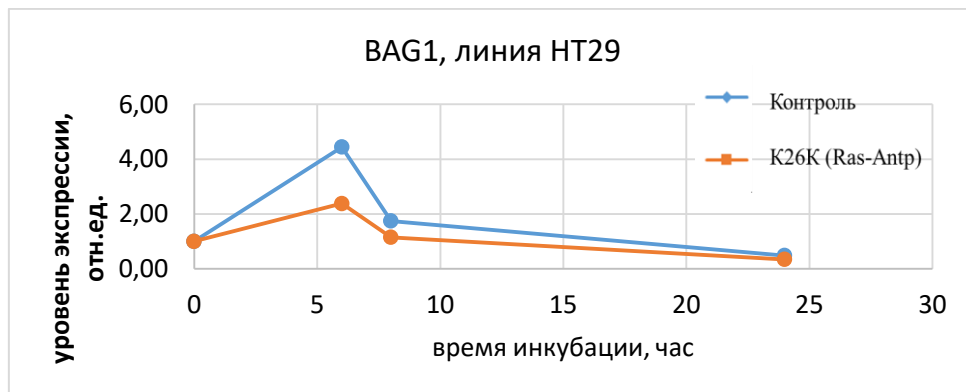


Рисунок 58 – Изменение экспрессии гена *BAG1* в культуре клеток HT29 при воздействии последовательности RAS-Antp

Таким образом, для клеток линии НТ 29 (мутация BRAF V600E) было установлено, что молекулярные изменения, индуцированные внесением последовательности RAS-Antp, имеют отличия от клеток мутантных по Ras. Наиболее значимыми изменениями экспрессии являлись ингибирование генов, ответственных за процессы пролиферации *CCND1*, *CCNB1*, *Ki67* и *STK15*. Причем, если для *CCND1* задержка в экспрессии приходится на интервал до 8 часов, для *CCNB1*, *Ki67* и *STK15* – после 8 часов инкубации. Было получено снижение экспрессии *TERT*, снижение уровня транскрипционных факторов *MYC*, *MYBL2*, *GRB7*, а также ингибирование генов, ответственных за процессы апоптоза – *BCL2*, *BAG1*, *BIRC5*.

При выполнении исследований по оценке молекулярных изменений, индуцированных в опухолевых клетках внесением пептидной последовательности RAS-Antp, было установлено, что данная последовательность оказывает антипролиферативные эффекты на все типы исследованных клеток (линии A549, НСТ116, НТ29). RAS-Antp ингибирует экспрессию генов, ответственных за процессы пролиферации и являющихся мишенями для RAS-BRAF киназного пути – *MYC* и *CCND1*. Как следствие ингибирования пролиферации наблюдается также снижение экспрессии генов *CCNB1*, *Ki67* и *STK15*. Исследование генов, ответственных за процессы апоптоза, выявило отличия в воздействии RAS-Antp на разные культуры, что, возможно, объясняется различиями в мутационном статусе исследуемых клеточных линий.

4.2.3 Результаты исследования воздействия пептидного ингибитора RAS-ГТФазы на клетки первичных культур рака желудка человека

В настоящее время рака желудка (РЖ) остается одной из ведущих причин смерти от онкологии, несмотря на различные стратегии в лечении достигнуто лишь незначительное улучшение долгосрочной выживаемости, а прогноз у пациентов с РЖ остается неблагоприятным. Молекулярные исследования установили важность мутаций в сигнальном пути RTK/RAS/MAPK при РЖ [5, 6, 26]. В связи с высокой частотой мутаций в сигнальном пути, на который

направлен пептидный препарат RAS-Antrp (K26K, Инг-Пас), нами проведен комплекс исследований по воздействию пептида на клетки первичных опухолевых культур РЖ.

Работа по получению и ведению первичных культур подробно описана в главе 2. Материалы и методы п.2.3.1. Работа с клеточными линиями. На первом этапе данного исследования (Рисунок 59) был оценен эффект последовательности RAS-Antrp (K26K) на клетки аденокарцином желудка после инкубации с пептидом в течение 24 и 48 часов.

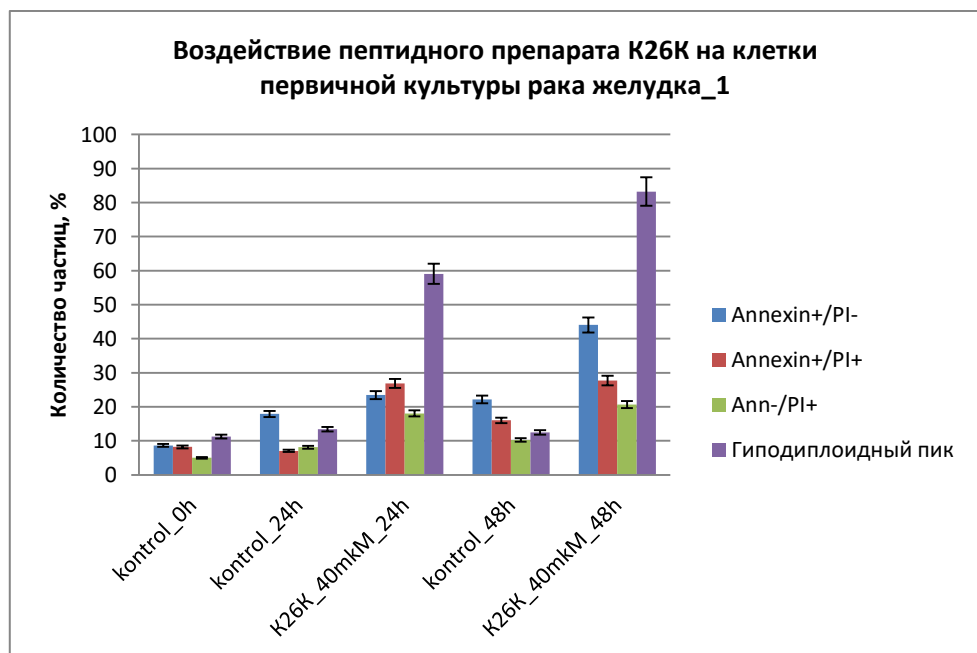


Рисунок 59 – Изменение уровня апоптоза в первичной культуре рака желудка после 24-х и 48-ми часовой инкубации с пептидной последовательностью K26K, средние значения трех экспериментов

Следующий этап исследования включал оценку и сравнение результатов воздействия K26K на материал первичных культур рака желудка и морфологически неизменной слизистой желудка того же пациента, полученные в ходе оперативного вмешательства (Рисунок 60 А и Б).

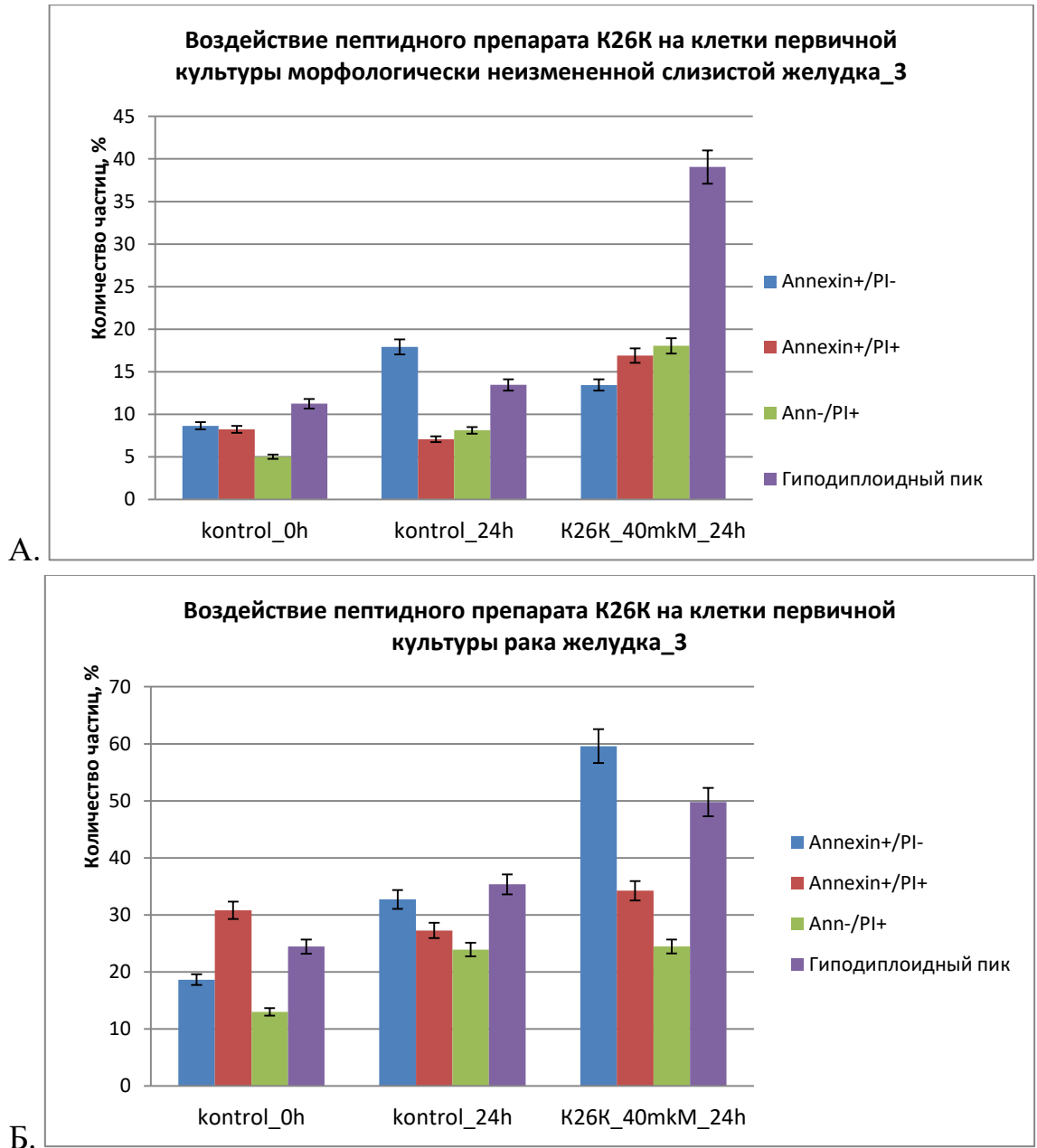


Рисунок 60 – Изменение уровня апоптоза в первичной культуре морфологически неизменной слизистой при раке желудка (А) и материале опухоли (Б) после 24-х и 48-ми часовой инкубации с пептидной последовательностью K26K

В результате проведенных экспериментов было показано, что пептидная последовательность K26K обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении клеток опухолей желудка, в меньшей степени воздействует на неизменную слизистую. Цитотоксический эффект в большей степени обусловлен увеличением уровня апоптоза в опухолевых клетках. Проведенные исследования могут являться дополнительным обоснованием для использования

разрабатываемого препарата – ингибитора RasГТФазы, в качестве противоопухолевой терапии при раке желудка.

4.2.4 Исследование на клеточных линиях HT29 и HCT116 сочетанного воздействия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы и химиопрепаратов

Для оптимизации результатов проводилась предварительная синхронизация культур в G0-фазе клеточного цикла. В настоящее время известно большое количество эффективных методов, позволяющих синхронизовать или вызвать остановку пролиферации в определенной фазе клеточного цикла, чтобы исключить влияние «посторонних» соединений, мы использовали метод обедненной культуральной среды. Снятие блока синхронизации или выход из синхронизации проводился путем удаления из среды лимитирующего фактора. При использовании метода обедненной среды таким фактором служит отсутствие питательных веществ и замена среды на новую, содержащую 10% ЭТС, что служит пусковым механизмом для выхода клеток из фазы G0. При снятии блока синхронизации происходит инициация роста культуры клеток, причем в течение первого цикла, или даже нескольких, сохраняется синхронность прохождения клетками фаз клеточного цикла.

На Рисунке 61 представлены результаты контрольных образцов до и после синхронизации по распределению клеток по фазам клеточного цикла.

Показано, что после синхронизации (контроль_синхр_0ч) 80,9% клеток находится в стадии G0/G1, через 24 часа после снятия блока синхронизации (контроль_синхр_24ч), количество клеток в G0/G1 снижается до 31,8% и возрастает количество клеток в S и G2/M фазах, 38,3 и 29,9%, соответственно. Стадия синхронизации в данном случае была необходима, так как исследуемые лекарственные препараты обладают цитостатической активностью и их эффект оценивался на активно пролиферирующих клетках после снятия блока синхронизации. Основным эффектом, который был оценен в данных исследованиях – цитотоксическое воздействие и оценка уровня апоптоза. Методом проточной

цитометрии с помощью окраски Annexin-PI были оценены уровни раннего апоптоза (An+/Pi-), позднего апоптоза (An+/Pi+) и некроза (An-/Pi+).

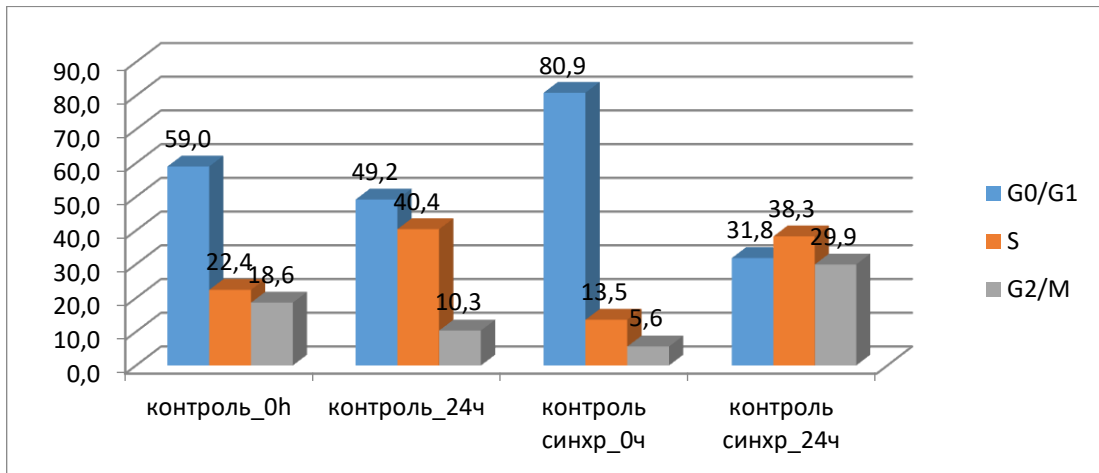


Рисунок 61 – Распределение по фазам клеточного цикла контрольных образцов линии HT29

Примечание – «Контроль» - клетки, растущие в полной питательной среде, не подвергшиеся инкубации без питательных веществ (10% FBS), «Контроль синхр» - клетки после 48-ми часовой инкубации в обедненной питательной среде - фетальная бычья сыворотка (0,5% FBS). Представлены средние значения двух экспериментов

На рисунке 62 представлены результаты изменений апоптоза и некроза в культуре клеток HT29 при воздействии исследуемых лекарственных препаратов.

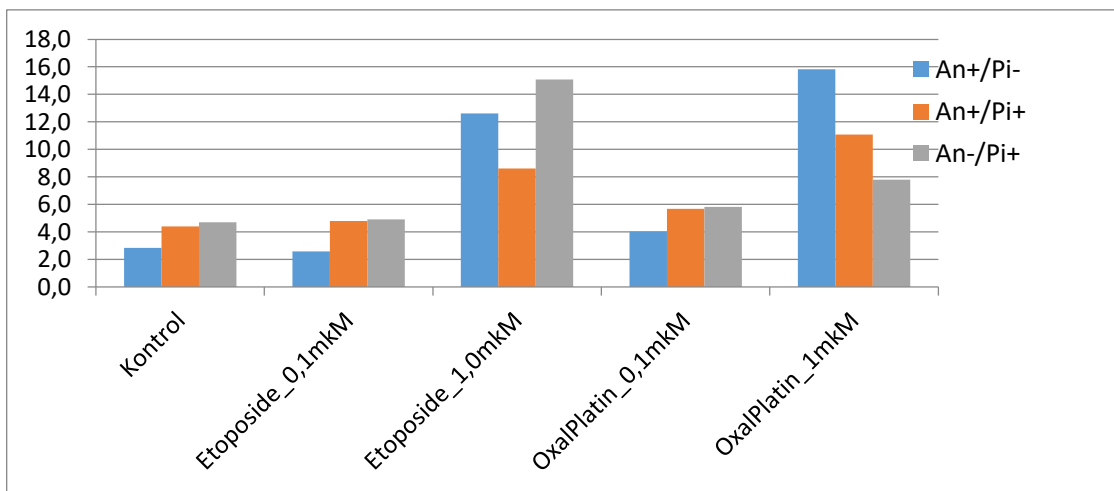


Рисунок 62 – Изменение соотношения в уровне раннего апоптоза (An+/Pi-), позднего апоптоза (An+/Pi+) и некроза (An-/Pi+) при инкубации синхронизированных методом обедненной среды клеток HT29 после снятия блока синхронизации и 24-х часовой инкубации с препаратами этопозид и оксалиплатин в концентрациях 0,1 мкМоль и 1 мкМоль

Оценку цитотоксического эффекта разрабатываемого пептидного препарата K26K (RasGT Инг-Rac) проводили при концентрациях от 0,2 мкМоль до 25 мкМоль. На рисунке 63 приведены изменения уровня апоптоза после 24-х часовой инкубации клеток HT29 с K26K в зависимости от концентрации.

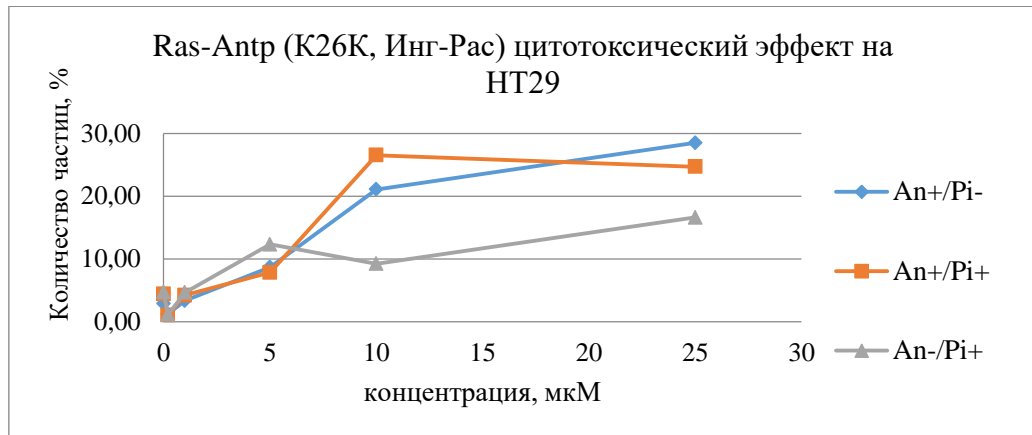


Рисунок 63 – Оценка уровня апоптоза в культуре клеток линии HT29 после снятия блока синхронизации и 24-х часовой инкубации с пептидным препаратом Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) в концентрациях от 0,2 мкМоль до 25 мкМоль
Примечание – Оценены уровни раннего апоптоза (An+/Pi-), позднего апоптоза (An+/Pi+) и некроза (An-/Pi+)

Показано, что основной цитотоксический эффект – увеличение уровня апоптоза. Уровень некроза клеток, отрицательных по Аннексину и положительных по пропидию йодиду, при максимальной исследуемой концентрации K26K (25 мкМ) составляет 16,6%. В то же время суммарный уровень апоптоза составляет 53,2%. Данные результаты согласуются с результатами исследований по оценке эффектов препарата K26K, полученными ранее при исследовании цитотоксического воздействия *in vitro*.

Для оценки сочетанного воздействия препарата Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) и лекарственных средств, применяемых в клинической практике, после снятия блока синхронизации к культуре клеток HT29 добавляли этопозид («Этопозид Эбеве», 100 мг/5 мл, раствор для инъекций) и оксалиплатин («Оксалиплатин Медак», лиофилизат для инфузий, 100 мг/фл.) в концентрациях 0,1 мкМ и 1 мкМ, а также пептидный препарат Ras-Antrp (K26K, Инг-Rac) в концентрациях от 0,2 мкМ до 25 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч с последующей оценкой

уровня индуцированного апоптоза и некроза в образцах. Изменение уровня суммарного апоптоза показано на рисунках 64 и 65.

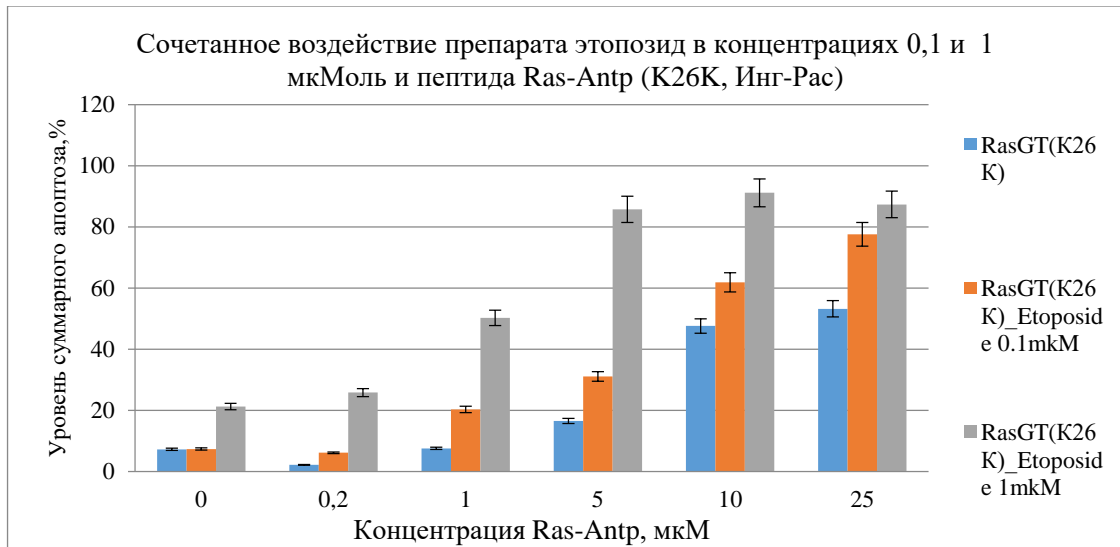


Рисунок 64 – Изменение уровня суммарного апоптоза (ранний апоптоз (An+/Pi-) и поздний апоптоз (An+/Pi+)) при сочетанном воздействии этопозид (0,1 и 1 мкМоль) и пептидного препарата Ras-Antrp (K26K, Инг-Рас) на клетки линии HT29 в течение 24-х часовой инкубации

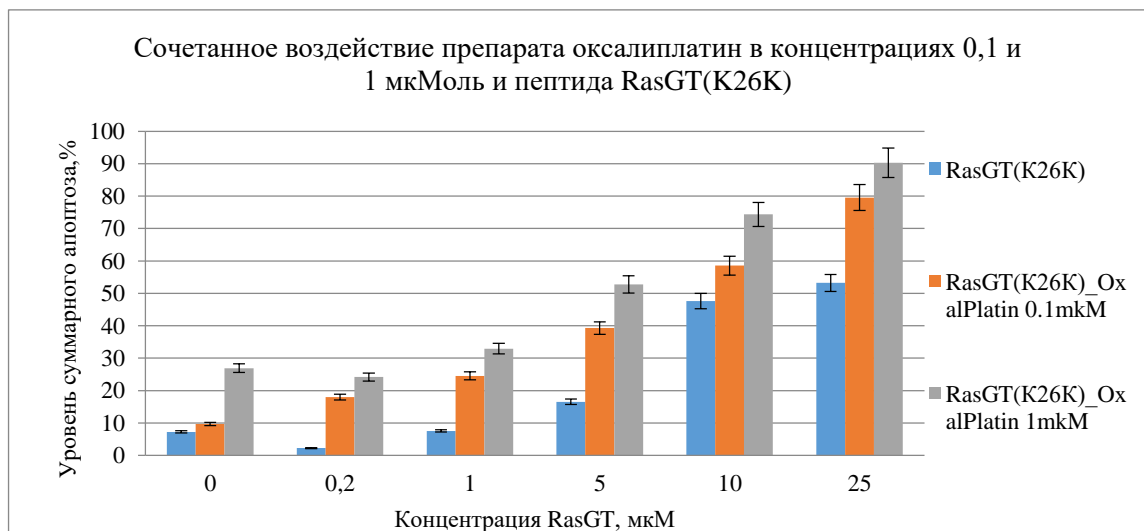


Рисунок 65 – Изменение уровня суммарного апоптоза (ранний апоптоз (An+/Pi-) и поздний апоптоз (An+/Pi+)) при сочетанном воздействии оксалиплатина (0,1 и 1 мкМоль) и пептидного препарата Ras- Antrp (K26K, Инг-Рас) на клетки линии HT29 в течение 24-х часовой инкубации

Для этопозид и оксалиплатина концентрация 0,1 мкМоль не оказывала цитотоксического эффекта на исследуемые клетки, в то время при концентрации 1 мкМоль, уровень апоптоза в образцах «0» составлял 21,2% для этопозид и 26,9%

для оксалиплатина. Как показано на рисунке 64, при сочетанном воздействии этопозид в концентрации 0,1 мкМоль и K26K в концентрациях от 1 мкМоль, уровень суммарного апоптоза достоверно возрастает. Наибольший интерес представляют результаты, полученные при концентрациях K26K 1 и 5 мкМ и обеих исследуемых концентрациях этопозид, в данных образцах было отмечено мультиплексирование эффектов препаратов, уровень апоптоза при сочетанном воздействии достоверно превышал суммарные значения, оказываемые исследуемыми препаратами в монорежиме. При применении оксалиплатина (Рисунок 65), достоверные увеличения апоптоза наблюдались при концентрации оксалиплатина в концентрации 0,1 мкМоль и начиная с сочетанного добавления K26K в концентрации 0,2 мкМоль. В то же время при концентрации оксалиплатина 1 мкМоль уровень апоптоза без воздействия K26K составил 26,9%, и внесение в образцы пептидного препарата K26K в концентрациях 0,2 и 1 мкМ не приводило к достоверным изменениям. При увеличении концентрации K26K до 5 мкМ и выше в образцах с оксалиплатином 1 мкМоль увеличение апоптоза было достоверным.

Таким образом, для препаратов этопозид и оксалиплатин было показано, что сочетанное их воздействие с пептидным препаратом Ras-GTP (K26K, Инг-Рас) способно индуцировать выраженную клеточную гибель и снижать действующие концентрации лекарственных препаратов.

При воздействии на клеточную линию НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека) было исследовано сочетанное влияние на процессы пролиферации и апоптоза лекарственных препаратов: оксалиплатин («Оксалиплатин Медак» лиофилизат для инфузий 100мг фл) в концентрациях от 0,1 мкМоль до 30 мкМоль и 5-Фторурацил («5-Фторурацил Эбеве», концентрат для приготовления раствора для инфузий 50мг/мл) в концентрациях от 0,1 мкМоль до 10 мкМоль, а также пептидного препарата Ras-GTP (K26K, Инг-Рас) в концентрациях от 0,2 мкМоль до 25 мкМоль.

Препарат оксалиплатин вызывает остановку клеточной пролиферации в G2 фазе клеточного цикла, в концентрациях от 1 мкМоль цитостатический эффект становится достоверным и уровень G2 фазы достигает $72 \pm 7\%$ (Рисунок 66).

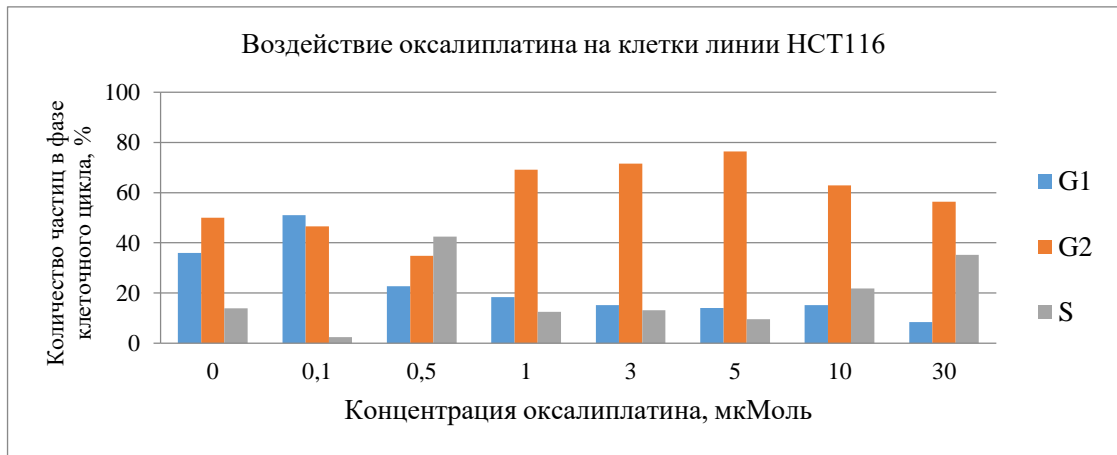


Рисунок 66 – Распределение по фазам клеточного цикла клеток линии HCT116, подвергшихся воздействию ЛП оксалиплатин в концентрациях от 0,1 мкМоль до 30 мкМоль

Уровень апоптоза имеет четкую зависимость от концентрации препарата (Рисунок 67).

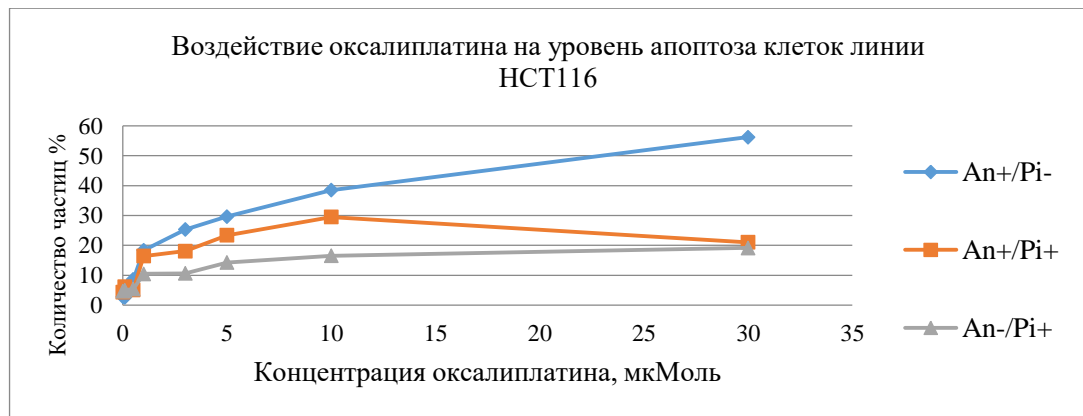


Рисунок 67 – Изменение соотношения в уровне раннего апоптоза (An+/Pi-), позднего апоптоза (An+/Pi+) и некроза (An-/Pi+) при инкубации синхронизированных методом обедненной среды клеток HCT116 после снятия блока синхронизации и 24-х часовой инкубации с препаратом оксалиплатин в концентрациях от 0,1 мкМоль до 30 мкМоль

Цитостатическое воздействие препарата 5-фторурацил (5-FU) проявляется в виде остановки пролиферации в S фазе клеточного цикла, на рисунке 8 представлены распределения/изменения в соотношении клеток в G0/G1, S и G2/M

фазах цикла в зависимости от концентрации 5-FU. В случае 5-FU остановка пролиферации происходит на S фазе (Рисунок 68).

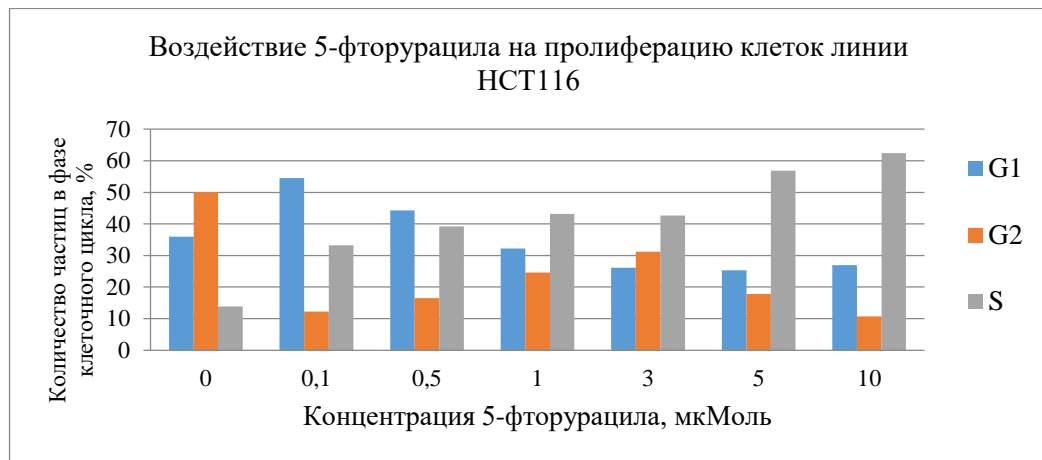


Рисунок 68 – Распределение по фазам клеточного цикла клеток линии НСТ116, подвергшихся воздействию ЛП 5-фторурацил в концентрациях от 0,1 мкМоль до 10 мкМоль

Также было показано, что при воздействии 5-FU в клетках линии НСТ116 увеличивается уровень апоптоза пропорционально концентрации ЛП (Рисунок 69).

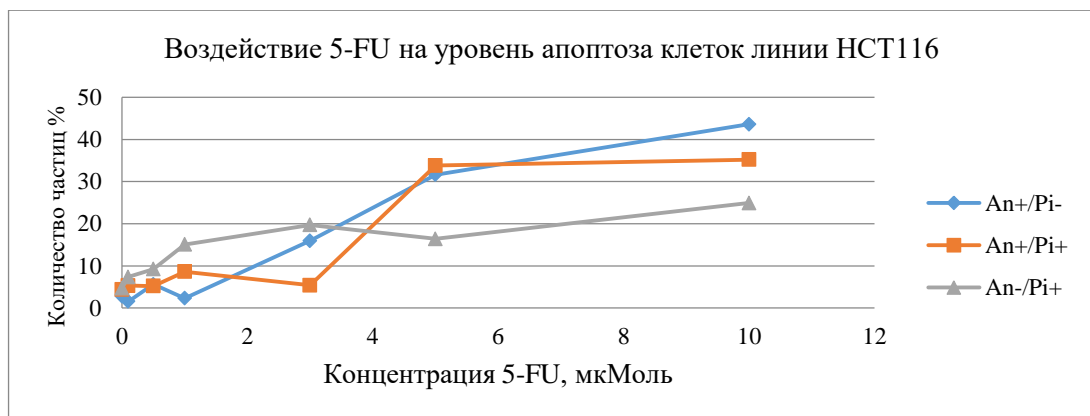


Рисунок 69 – Изменение соотношения в уровне раннего апоптоза (An+/Pi-), позднего апоптоза (An+/Pi+) и некроза (An-/Pi+) при инкубации синхронизированных методом обедненной среды клеток НСТ116 после снятия блока синхронизации и 24-х часовой инкубации с препаратом 5-фторурацил в концентрациях от 0,1 мкМоль до 10 мкМоль

При исследовании сочетанного воздействия пептидного препарата К26К и ЛП оксалиплатин и 5-фторурацил на клетки НСТ116 было показано (Рисунки 70, 71), что при сочетанном использовании уровень апоптоза достоверно

увеличивается ($p < 0,05$), что позволяет добиться высоких цитотоксических эффектов даже при низких концентрация препаратов.

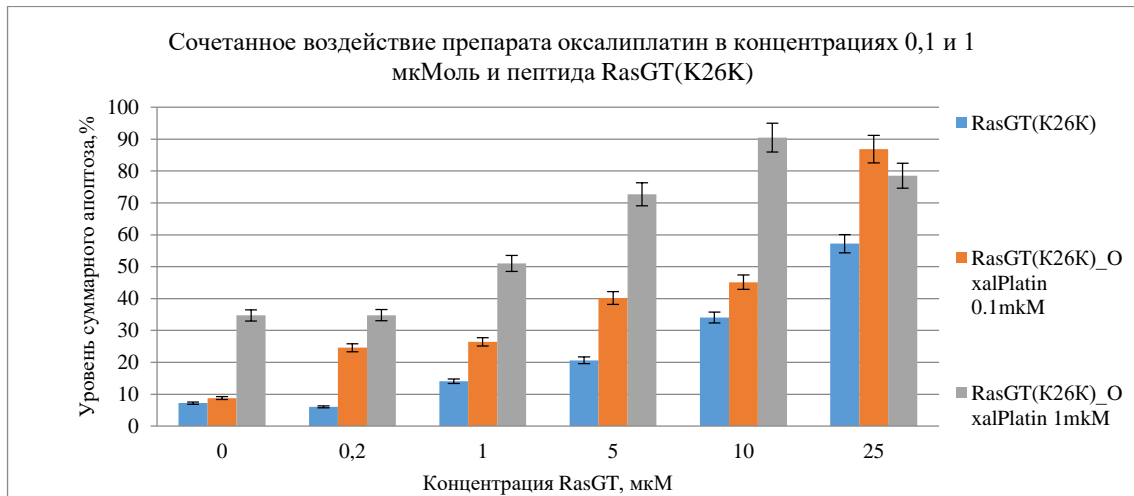


Рисунок 70 – Изменение уровня суммарного апоптоза (ранний апоптоз (An+/Pi-) и поздний апоптоз (An+/Pi+)) при сочетанном воздействии оксалиплатина (0,1 и 1 мкМоль) и пептидного препарата RasGT(K26K, Инг-Рас) на клетки линии НСТ116 в течение 24-х часовой инкубации

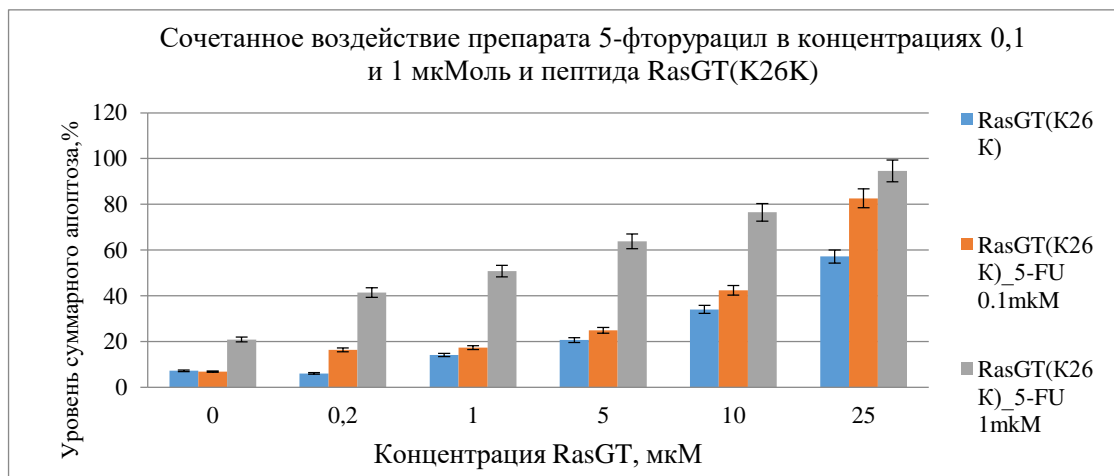


Рисунок 71 – Изменение уровня суммарного апоптоза (ранний апоптоз (An+/Pi-) и поздний апоптоз (An+/Pi+)) при сочетанном воздействии 5-FU (0,1 и 1 мкМоль) и пептидного препарата RasGT(K26K, Инг-Рас) на клетки линии НСТ116 в течение 24-х часовой инкубации

На следующем этапе оценки сочетанного воздействия лекарственных препаратов и пептидного препарата K26K, было проведено исследование по оценке воздействия на рост и активность клеточной популяции линии НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки) с помощью метода RTCA icelligence.

Так как предполагалось возможное сочетанное применение разрабатываемого препарата К26К и препаратов, используемых в клинической практике в различных режимах, проведенное исследование включало различные варианты внесения препаратов к активно пролиферирующим клеткам. Клетки НСТ116 вносились в лунки специального планшета E-Plate icelligence, 3,5 часа инкубировались для прикрепления их к дну лунки, затем добавлялся К26К в концентрации 10 мкМоль, проводили инкубацию в течение 24 часов, измеряя показатель клеточного индекса на всех этапах эксперимента. Далее проводили смену питательной среды. В контрольных образцах среду заменяли на полную питательную среду DMEM+10% FBS. В образцах «К26К» после 24-часовой инкубации с К26К среду заменяли на DMEM+10% FBS; в образцах «К26К_10мкМ_Oxaliplatin...» — на среду, содержащую оксалиплатин в концентрациях 0,1 нМоль (Рисунок 72, А), 0,25 нМоль (Рисунок 72, Б) и 0,5 нМоль (Рисунок 72, В). В образцах «К26К_10мкМ_(OxaliPlatin...нМ+К26К_10мкМ)» смена среды проводилась на среду, содержащую и К26К 10 мкМоль и оксалиплатин в соответствующей концентрации.

Как видно из рисунков 72 А и Б, даже при концентрациях оксалиплатина не оказывающих достоверных эффектов на процессы пролиферации, 0,1 и 0,25 нМоль, внесение К26К в концентрации 10 мкМоль приводит к резкому замедлению роста опухолевых клеток, при двукратном режиме введения К26К наблюдается остановка роста клеточной культуры.

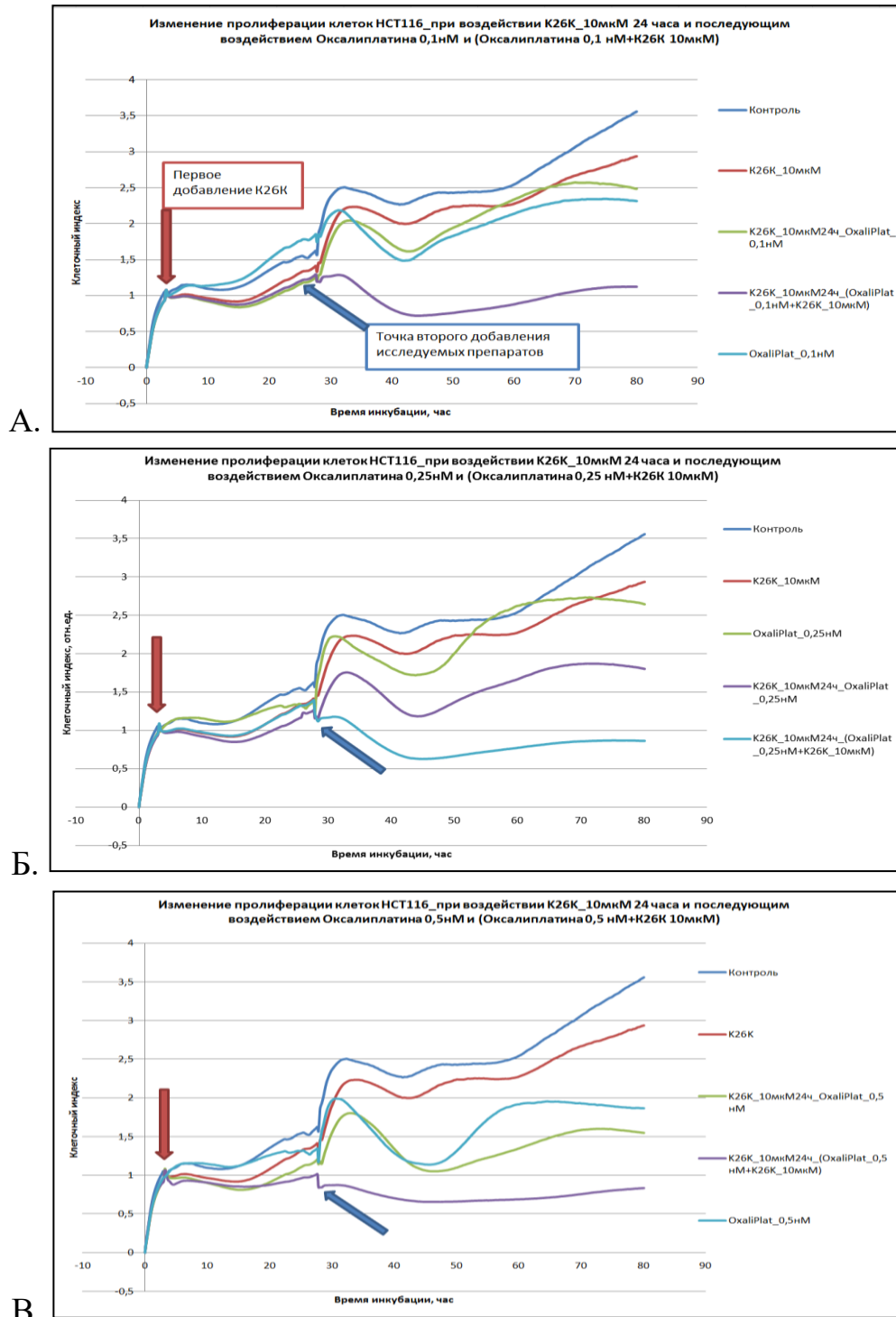


Рисунок 72 – Исследование сочетанного воздействия препарата оксалиплатин и пептидного ингибитора RasГТФазы (K26K) на пролиферацию и рост культуры клеток линии HCT116 при одно- и двукратном добавлении K26K в концентрации 10 мкМ и концентрациях оксалиплатина 0,1 нМоль (А), 0,25 нМоль (Б) и 0,5 нМоль (В)

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили сделать вывод о перспективности использования разрабатываемого препарата

K26K (Инг-Рас) в сочетанном режиме с препаратами химиотерапии. Применение K26K (Инг-Рас) позволяет добиться стойких анитипролиферативных и цитотоксических эффектов с меньшими концентрациями таких препаратов как оксалиплатин и 5-фторурацил, снизить концентрации ЛП, что, возможно позволит добиться снижения побочных эффектов и увеличить эффективность химиотерапии.

4.3 Исследование специфической фармакологической активности *in vivo* пептидного ингибитора Ras-ГТФазы K26K (Инг-Рас)

В данном разделе представлены результаты изучения специфической фармакологической активности *in vivo* лекарственного средства ингибитора Ras-ГТФазы на ксенографтные модели, полученные путем подкожной трансплантации мышам линии BALB/c: опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки человека (НТ-29); опухолевых клеток аденокарциномы легкого человека (А549). Изучена специфическая фармакологическая активность *in vivo* при внутрибрюшинном введении ингибитора Ras-ГТФазы K26K (Инг-Рас) на модели перевиваемой опухоли аденокарциномы толстой кишки человека (НТ-29) и при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы (K26K) на модели рака легкого (А549).

4.3.1 Оценка противоопухолевой эффективности K26K на модели подкожно трансплантированной опухоли аденокарциномы толстой кишки человека (НТ-29)

При исследовании динамики роста опухоли и выживаемости мышей линии BALBc (NUDE) с подкожно трансплантированной опухолью культуры НТ-29 было показано, что в обеих группах с внутрибрюшинным введением исследуемого пептидного ингибитора наблюдается торможение роста опухолевого узла (Рисунок 73). Также было установлено, что увеличение концентрации вводимого ингибитора Ras-ГТФазы с 10 мг/кг до 20 мг/кг, не приводит к усилению эффекта. Анализ торможения роста опухоли НТ-29 показал достоверное ($p < 0.05$) и значимое ($> 50\%$) торможение роста опухолевого узла при

обеих дозах ингибитора Ras-ГТФазы. Однако, как показано на рисунке 74, наблюдалось снижение значения ТРО после двух недель применения ингибитора Ras-ГТФазы и значительное снижение на 24-27 день эксперимента.

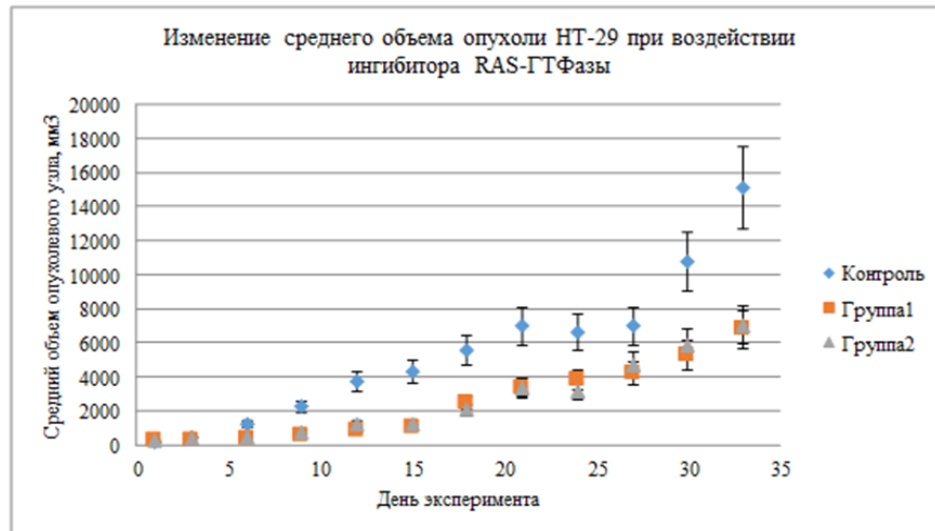


Рисунок 73 – Динамика роста опухолевых узлов у мышей BALBc с подкожно перевитой аденокарциномой толстой кишки человека HT-29 при внутрибрюшинном введении ингибитора Ras-ГТФазы (K26K) в дозах 10 мг/кг до 20 мг/кг для групп 1 и 2, соответственно

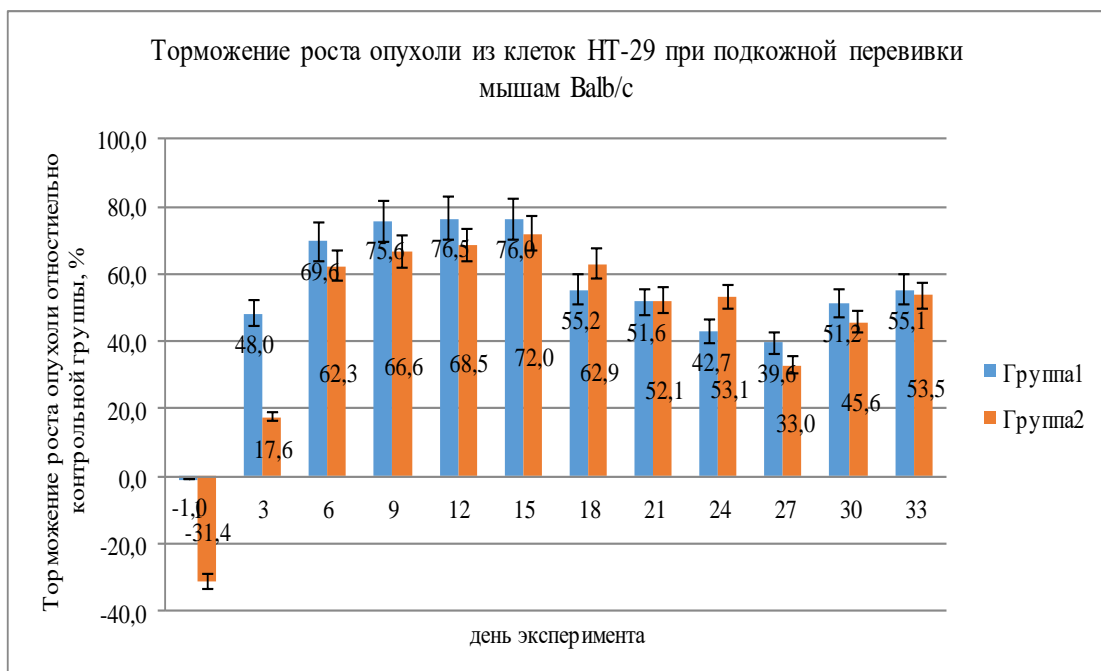


Рисунок 74 – Торможение роста подкожно трансплантированной опухоли HT-29 при внутрибрюшинном применении ингибитора Ras-ГТФазы K26K

Показано, что опухолевые узлы отличались большими размерами, наличием изъязвлений. Анализ выживаемости показал, что применение обеих доз лечения (0,2 мг/мышь (10 мг/кг) и 0,4 мг/мышь (20 мг/кг)) при режиме введения через день увеличивает время жизни экспериментальных животных. Однако, в случае с опухолями из клеток НТ-29, наблюдалась низкая гибель животных, так в контрольной группе первая погибшая мышь была на 15 день, а на 30 день эксперимента количество погибших животных составило 4 шт. (40%). В опытных группах погибла одна мышь в группе 1 на 32 день эксперимента.

Таким образом, в связи с низкой летальностью, сделать достоверное заключение об эффекте применения К26К (Инг-Рас) на выживаемость мышей данных групп, не представляется возможным.

4.3.2 Оценка противоопухолевой эффективности К26К на модели подкожно трансплантированной опухоли аденокарциномы рака лёгкого человека (A549)

При исследовании динамики роста опухоли и выживаемости мышей линии BALBc/nude с подкожно трансплантированной опухолью культуры A549 достоверных отличий между самцами и самками внутри каждой группы получено не было, поэтому данные самцы-самки были объединены.

Анализ выживаемости показал, что применение обеих доз лечения (0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10 мг/кг)) при режиме введения через день существенно увеличивают время жизни экспериментальных животных. На момент 100% гибели животных в контрольной группе, получавшей инъекции NaCl, в группе с вводимой дозой 5 мг/кг было живо 66%, а в группе с дозой 10 мг/кг – 60% животных. При этом дальнейшее наблюдение показало, что в группе с дозой 10 мг/кг гибели животных не наблюдается при наблюдении более 10 дней после гибели всех животных в контрольной группе. В группе с дозой 5 мг/кг за этот период наблюдения осталось живо 33% животных (Рисунок 76).

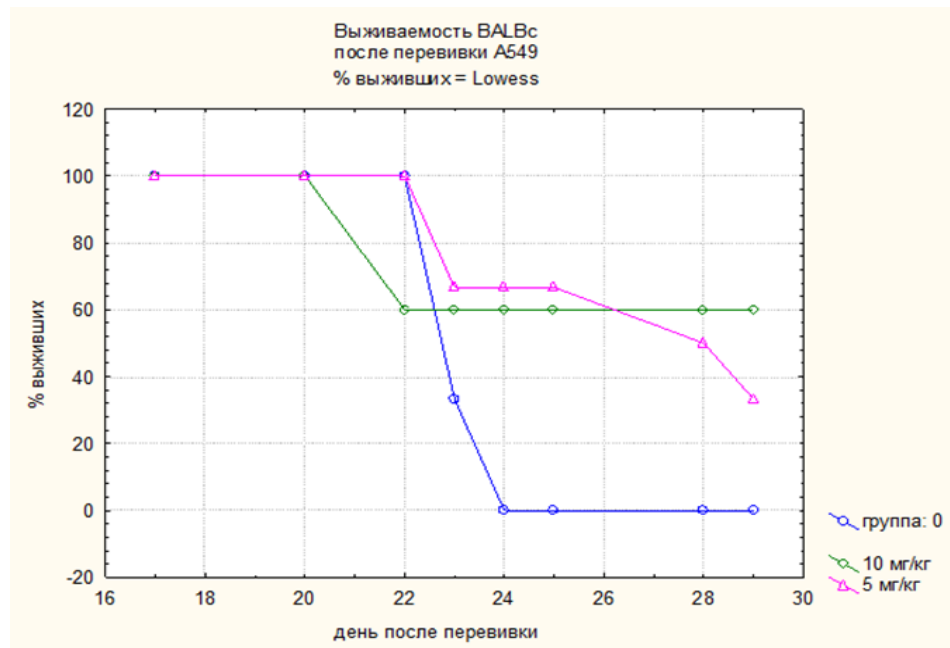


Рисунок 76 – Кривые выживаемости мышей линии BALBc/nude (самки+самки) с подкожно трансплантированной опухолью аденокарциномы легкого человека (A549) при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы в дозах 0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10мг/кг)

Получены достоверные отличия увеличения продолжительности жизни животных с контролем для групп 1 и 2. В группе 1 (0,1 мг/мышь (5 мг/кг)) увеличение продолжительности жизни животных составило 16% относительно контрольной группы ($p < 0,01$); в группе 2 (0,2 мг/мышь (10мг/кг)) увеличение продолжительности жизни животных составило 36,3 % относительно контрольной группы ($p < 0,01$).

Таким образом, для подкожно трансплантированной опухоли культуры A549 (рак легкого, человек) было доказано увеличение выживаемости при введении ингибитора Ras-ГТФазы K26K (Инг-Рас) по схеме введения препарата через день.

Изучение динамики роста подкожно трансплантированной опухоли – аденокарциномы легкого человека у мышей BALBc/nude на фоне введения ингибитора Ras-ГТФазы при 2 дозах применения показало достоверное торможение роста опухоли. Торможение роста составило (на момент 100% гибели группы контроля) для группы с режимом введения через день и дозой 10 мг/кг – 57,3%, а для группы с дозой 5 мг/кг -30,5% (Рисунок 77).

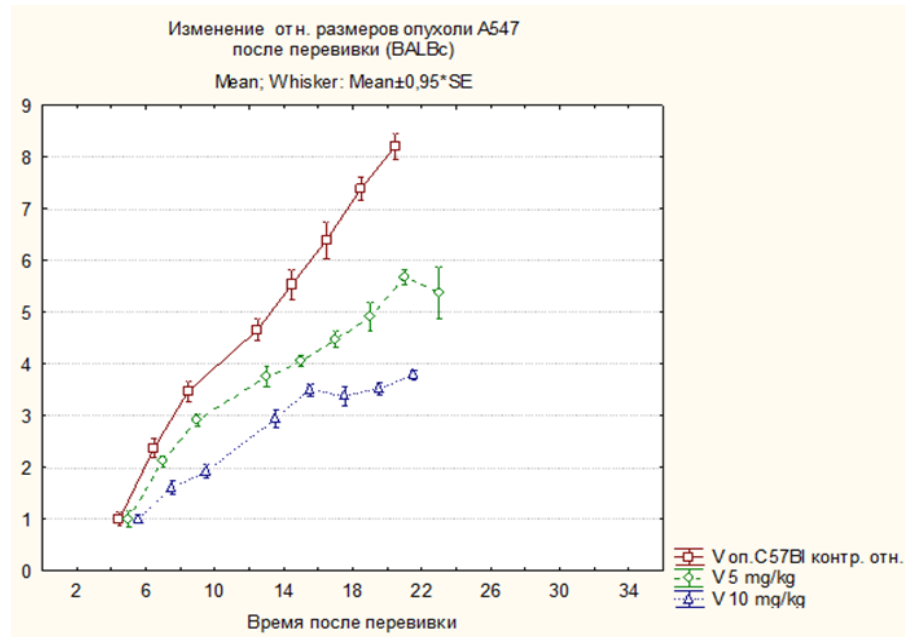


Рисунок 77 – Изменение объема подкожно трансплантированных опухолей аденокарциномы легкого человека (A549) в группах мышей линии BALBc/nude при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы в дозах 0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10мг/кг)

Как показано на рисунке 77, минимальные различия в объемах опухолей наблюдались с 8 дня после перевивки опухолей, после 1 инъекции ингибитора Ras-ГТФазы. На 22 день после перевивки (после 8 инъекций исследуемого лекарственного средства, в режиме введения через день) отличия между группами были максимальны (Рисунок 78).

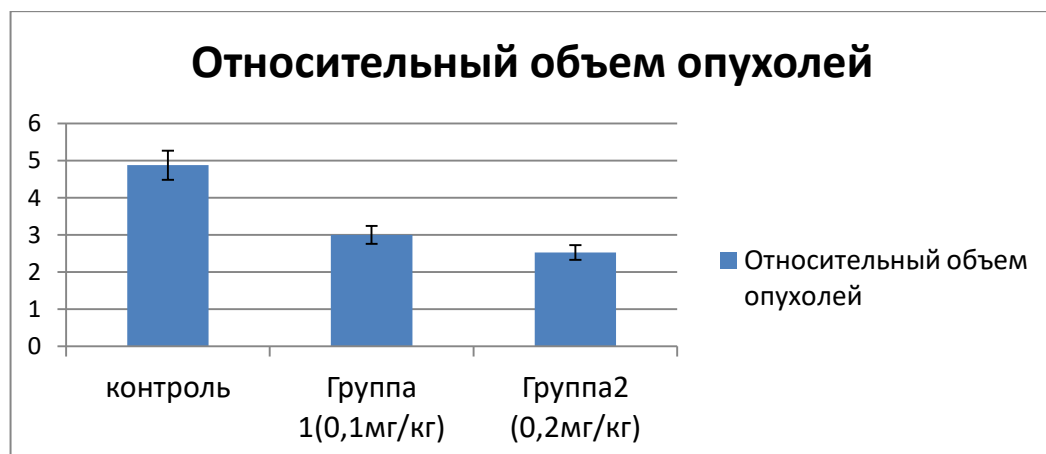


Рисунок 78 – Гистограмма изменения относительного объема опухолей для двух исследуемых групп мышей линии BALBc/nude при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы в дозах 0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10мг/кг)

На рисунке 78 представлены изменения относительного объема (относительно объема опухоли на момент начала введения ЛС) опухолей в исследуемых группах на 22 день после перевивки.

Изучение динамики роста подкожно трансплантированной опухоли – аденокарциномы легкого человека у мышей NUDE на фоне введения ингибитора Ras-ГТФазы при 2 дозах применения показало достоверное торможение роста опухоли в обеих группах, однако наилучший эффект был достигнут при внутривенном введении ЛС в дозе 0,2 мг/мышь (10мг/кг).

Таким образом, было показано, что лекарственное средство на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, обладает противоопухолевым эффектом в отношении клеток немелкоклеточного рака легкого человека (A549).

Проведенные исследования специфической фармакологической активности лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K) показали, что данная последовательность проявляет противоопухолевую активность в отношении клеток опухолей различной локализации. Исследования показали высокую активность в отношении опухолевых клеток рака лёгкого и рака толстой кишки в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

4.4 Токсикологические исследования

В токсикологических исследованиях были использованы лабораторные линии животных, рекомендованных для проведения соответствующих видов исследований: мыши, крысы, кролики, морские свинки. Выбор релевантных видов экспериментальных животных для проведения доклинических исследований безопасности при разработке нового лекарственного средства был обоснован соответствующими нормативными документами: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18 «О Руководстве по исследованию фармакологической безопасности лекарственных препаратов для

медицинского применения». Препарат Инг-Рас включает функциональную последовательность – фрагмент белка RAF, взаимодействующий с белком RAS. Анализ гомологичности соответствующих последовательностей у исследованных видов животных показывает 100% совпадение аминокислотных остатков как в гене RAS, так и в гене RAF.

4.4.1 Токсикологические исследования при однократном введении (острая токсичность)

Исследование острой токсичности пептидного ингибитора RAS-ГТФазы (K26K) на крысах линии Sprague-Dawley

При внутривенном введении тестируемого препарата наблюдалась 100%-ная смертность самцов животных в дозах 120 и 90 мг/кг в первый день исследования на протяжении 3-х ч после введения. В группе, получавшей дозу 120 мг/кг, было использовано по 2 самца и 2 самки, остальные животные были исключены из эксперимента, поскольку введение им препарата вызвало бы неминуемую гибель. У самок при внутривенном введении также наблюдалась 100%-ная смертность в дозах 120 и 90 мг/кг, однако при введении дозы 90 мг/кг часть животных погибла на второй день исследования. Кроме того, наблюдалась гибель одной самки, получившей дозу 60 мг/кг. При внутрибрюшинном введении наблюдалась гибель 2-х самцов из группы, получавшей дозу 250 мг/кг, на 12-й день исследования. Гибели самок при данном способе введения зарегистрировано не было.

Основными клиническими проявлениями токсического действия тестируемого препарата при внутривенном введении являлись: посинение ушей и хвоста, покраснение глаз, поза на боку, нарушение походки и затрудненное дыхание, наблюдавшиеся во всех группах, получавших препарат. Степень проявления данных признаков находилась в прямой зависимости от вводимой дозы. Кроме того, у животных, получавших препарат в дозах 60 мг/кг и выше, в первый день после введения присутствовала кровь в моче. В последующие дни исследования во всех группах, кроме получавшей самую низкую дозу,

наблюдалась некротизация части хвоста ниже места введения. При внутрибрюшинном способе введения основными клиническими признаками в первый день после введения являлись лежачая поза на боку, нарушение походки и впалые бока, а в последующие дни - хромодакриорея, сгорбленность, снижение мышечного тонуса, вздутие живота и расстройство кишечника. Описанные признаки наблюдались только в дозах выше 100 мг/кг.

Анализ прироста массы тела выявил статистически значимое снижение данного показателя у самцов животных при внутривенном введении в группах, получавших тестируемый препарат в дозах 60 и 30 мг/кг на 7-й и 14-й дни исследования как относительно контрольной группы, так и группы, получавшей тестируемый препарат в дозе 15 мг/кг. При внутрибрюшинном введении у самцов наблюдалась тенденция к снижению прироста массы тела, однако статистически значимых различий установлено не было. У самок статистически значимых различий по массе тела между экспериментальными группами при обоих способах введения не наблюдалось.

Статистически значимых межгрупповых различий по потреблению корма выявлено не было.

Вскрытие погибших животных при внутривенном введении препарата выявило множественные кровоизлияния в тимусе, легких и сердце, а также пенные выделения из легких и кровотечение из мочевыводящих путей. У отдельных животных наблюдалось увеличение брыжеечных лимфоузлов и кровоизлияния в кишечных бляшках.

При плановой некропсии выживших животных во время визуального осмотра покровов тела, полостей тела и их содержимого у животных с внутривенным введением тестируемого препарата патология не выявлена, за исключением некротизации нижней части хвоста в группах, получавших препарат в дозах выше 15 мг/кг. У одного животного, получившего дозу 60 мг/кг, была отмечена деформация семенника, однако данный признак не наблюдался при более высоких дозах, поэтому не может быть однозначно связан с действием тестируемого препарата. У животных с внутрибрюшинным введением препарата

отмечались вздутие кишечника, деформация печени, селезенки и тимуса с изменением их консистенции и цвета, а также с уменьшением размеров. Также у отдельных животных наблюдалось патологические изменения в семенниках, почках и надпочечниках. Степень проявления описанных признаков находилась в прямой зависимости от вводимой дозы. Не было выявлено никаких отклонений от нормы только у животных, получавших самую низкую дозу (15 мг/кг) препарата.

Анализ массы органов не выявил статистически значимых различий между группами, за исключением увеличения относительно контрольной группы относительной массы надпочечников у самцов, получавших внутривенно дозу 60 мг/кг, а также снижения относительной массы почек у самцов, получавших внутрибрюшинно дозу 250 мг/кг.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования сделано заключение о том, что дозой, не вызывающей неблагоприятных эффектов (NOAEL) при внутрибрюшинном способе введения, может считаться доза 15 мг/кг, при внутривенном введении даже минимальная использованная доза вызывала кратковременные токсические эффекты.

Исследование острой токсичности пептидного ингибитора RAS-ГТФазы (K26K) на мышях

При внутривенном введении тестируемого препарата наблюдалась гибель 1 самки, получавшей препарат в дозе 75 мг/кг в первый день исследования и одного самца, получавшего дозу 50 мг/кг на 13-й день исследования. При внутрибрюшинном введении наблюдалась гибель 5-и самцов из группы, получавшей дозу 500 мг/кг, 4-х самцов из группы, получавшей дозу 250 мг/кг, и 2-х самцов из группы, получавшей дозу 150 мг/кг. У самок была зарегистрирована гибель 5 животных в каждой из вышеописанных групп.

Основным клиническим эффектом тестируемого препарата при внутривенном введении являлось посинение хвоста, наблюдавшееся во всех группах, получавших препарат. Однако, данный эффект являлся кратковременным и обратимым. При внутрибрюшинном способе введения основными клиническими признаками в первые сутки после введения препарата

являлись снижение общего тонуса, цианоз, пилоэрекция, лежачая поза, нарушение походки и сгорбленность.

В ходе анализа массы тела животных и ее прироста статистически значимых межгрупповых различий ни у самцов, ни у самок при обоих способах введения выявлено не было. Статистически значимых межгрупповых различий по потреблению корма также выявлено не было.

Вскрытие погибших животных не выявило явных признаков патологии.

При плановой некропсии выживших животных во время визуального осмотра у животных с внутривенным введением тестируемого препарата отмечались кровоизлияния в тимусе. Эти изменения наблюдались во всех опытных группах независимо от дозы. Кроме того, у одного самца, получавшего тестируемый препарат в дозе 75 мг/кг, было отмечено уменьшение массы семенников. У животных с внутрибрюшинным введением препарата, не было обнаружено никакой патологии.

Анализ массы органов выявил статистически значимое увеличение относительно контрольной группы абсолютной и относительной массы тимуса у самцов, получавших внутривенно дозу 75 мг/кг. При внутрибрюшинном способе введения статистически значимых межгрупповых различий в массе органов выявлено не было.

На основании результатов проведенного исследования сделано заключение о том, что максимально переносимой дозой (МПД) тестируемого препарата для мышей является доза 50 мг/кг.

В ходе проведенного исследования по изучению острой токсичности лекарственного средства ингибитора Ras-ГТФ-азы при его внутривенном и внутрибрюшинном введении мышам и крысам линии Sprague-Dawley (SD), было установлено следующее:

– гибель крыс при внутривенном введении наблюдалась начиная с дозы 60 мг/кг, мышей начиная с дозы 75 мг/кг, при внутрибрюшинном введении гибель крыс наблюдалась начиная с дозы 250 мг/кг, гибель мышей – начиная с дозы 150 мг/кг;

– вскрытие выживших животных при внутривенном способе введения не выявило изменений внутренних органов, при внутрибрюшинном способе введения были выявлены кровоизлияния внутренних органов, что свидетельствует о местно-раздражающем действии препарата;

– клинические признаки, наблюдаемые при введении препарата, являлись кратковременными и обратимыми.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования острой токсичности было сделано заключение о том, что максимально переносимой дозой (МПД) тестируемого препарата для мышей может считаться доза 60 мг/кг, для крыс 50 мг/кг.

4.4.2 Токсикологические исследования подострой (субхронической) токсичности при внутривенном и внутрибрюшинном введении

На данном этапе исследования изучались токсические эффекты лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы K26K (Инг-Рас) при его многократном внутривенном введении двум видам животных (самцы и самки крыс SD, кролики) в течение 28 дней с последующим 14-дневным периодом отмены в трех экспериментальных дозах.

Токсикологические исследования подострой (субхронической) токсичности лекарственного средства при его внутривенном введении у крыс

Клинических признаков токсичности исследуемого препарата у крыс в ходе исследования не наблюдалось, за исключением некротизации участка хвоста ниже области введения у животных, получавших препарат в максимальной дозе. Была зарегистрирована гибель одного самца (№ 32) на 14-й день исследования из группы, получавшей тестируемый препарат в дозе 8,6 мг/кг. Однако учитывая, что гибели животных, получавших более высокие дозы препарата, не наблюдалось, можно предположить, что единственный случай гибели связан с индивидуальной реакцией организма.

Статистически значимых межгрупповых различий массы тела и ее прироста у самок животных, получавших тестируемый препарат в трех исследуемых дозах,

в ходе исследования не наблюдалось. У самцов отмечалось статистически значимое снижение прироста массы тела на всем протяжении исследования, начиная с 7-го дня, в группе, получавшей максимальную дозу, на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни исследования в группе, получавшей среднюю дозу, и на 14-й, 21-й и 28-й дни в группе с минимальной дозой.

Статистически значимых отклонений в потреблении корма у животных, получавших тестируемый препарат, выявлено не было.

Результаты биохимического анализа сыворотки крови показали, что у самцов при введении тестируемого препарата наблюдалось статистически значимое увеличение уровней общего холестерина и общего белка в группе, получавшей дозу 34,4 мг/кг, а также уровня триглицеридов в группе, получавшей дозу 17,2 мг/кг. Данные изменения были обратимыми и не наблюдались после периода отмены. Однако в группе, получавшей дозу 17,2 мг/кг, на 43-й день исследования наблюдалось статистически значимое повышение уровня глюкозы относительно контроля. У самок в группе, получавшей малую дозу исследуемого препарата, на 29-й день исследования было зарегистрировано статистически значимое увеличение уровня кальция, обратимое к концу периода отмены.

В показателях гемостаза у самцов крыс, получавших тестируемый препарат в трех экспериментальных дозах, на 29-й и 43-й день исследования не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий. У самок, получавших тестируемый препарат в дозе 34,4 мг/кг, на 29-й день исследования было обнаружено статистически значимое возрастание концентрации фибриногена, обратимое к 43-му дню исследования.

У крыс обоего пола, получавших исследуемый препарат в дозах 8,6 мг/кг, 17,2 мг/кг и 34,4 мг/кг на 29-й день исследования в составе гемограммы не было выявлено статистически значимых отклонений относительно контрольного уровня, однако наблюдалась слабая тенденция к снижению количества эритроцитов (RBC), концентрации гемоглобина (Hb) и гематокрита (HCT). По окончании 14-дневного периода отмены введения у самцов, получавших препарат во всех исследуемых дозах (8,6 мг/кг, 17,2 мг/кг и 34,4 мг/кг), сохранялась слабая

тенденция к гипохромной анемии (\downarrow RBC, \downarrow Hb, \downarrow HCT, \downarrow MCH, \uparrow RDW), дозозависимого эффекта при этом не отмечалось. Статистически значимые изменения относительно контрольных животных у самцов были зарегистрированы в виде снижения уровня гемоглобина при введении препарата в дозе 17,2 мг/кг, и повышения уровня анизоцитоза (RDW) при введении дозы 34,4 мг/кг. У самок по окончании периода отмены введения также сохранялась слабая тенденция к гипохромной анемии вне зависимости от дозы препарата. При этом статистически значимо вырос средний объем тромбоцитов в ответ на введение дозы 34,4 мг/кг.

При плановой некропии по окончании исследования макроскопических изменений внутренних органов обнаружено не было. Анализ массы органов на 29-й день исследования у самок животных выявил тенденцию к увеличению относительных значений массы селезенки при введении препарата во всех экспериментальных дозах. Статистически значимое увеличение данного показателя относительно контрольных значений было зарегистрировано в группах, получавших дозы 8,6 и 34,4 мг/кг. Кроме того, у самок было отмечено статистически значимое увеличение относительной массы почек при введении дозы 17,2 мг/кг. Отклонения данных показателей были обратимыми и не наблюдались к 43-му дню исследования. У самцов на 29-й день исследования не было выявлено отклонений в показателях массы органов относительно контрольной группы. Однако, на 43-й день исследования в группах самцов, получавших тестируемый препарат в дозах 8,6 и 34,4 мг/кг, наблюдалось статистически значимое по сравнению с группой, получавшей физраствор, увеличение относительной массы головного мозга.

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что тестируемый препарат во всех исследуемых дозах вызывал те или иные токсические эффекты. В наименьшей использованной дозе 8,6 мг/кг токсические проявления были минимальными, обратимыми и клинически незначимыми. Наблюдаемые эффекты во многом зависели от скорости внутривенного введения препарата и концентрации активного вещества. Поэтому, применение

тестируемого препарата в дозе, эквивалентной терапевтической для человека, может быть рекомендовано для клинических исследований.

Токсикологические исследования подострой (субхронической) токсичности лекарственного средства при его внутривенном введении у кроликов

В исследовании подострой токсичности лекарственного средства – пептидный ингибитор RAS-ГТФазы на кроликах не была зафиксирована смертность животных. Признаков интоксикации организма животных также выявлено не было. На всем протяжении исследования статистически значимых различий между группами животных, получавших тестируемый препарат в двух различных дозах, и контрольными животными, получавшими носитель, по приросту веса тела не наблюдалось. Статистически значимых различий между группами животных, получавших тестируемый препарат в двух различных дозах и контрольными животными, получавшими носитель, по потреблению корма не наблюдалось.

В ходе анализа гематологических показателей и показателей биохимии сыворотки крови животных, подвергнутых эвтаназии на 29 день исследования, статистически значимых различий между животными, получавших тестируемый препарат в двух различных дозах и контрольными животными, получавшими носитель, выявлено не было. При плановой некропии животных во время визуального осмотра внешнего состояния тела, внутренних поверхностей и проходов, полостей черепа, грудной, брюшной и тазовой полостей с находящимися в них органами и тканями, шеи с органами и тканями, а также каркаса и скелетно-мышечной системы, морфологические признаки отклонений от нормы, связанных с действием исследуемых препаратов, выявлены не были. Статистически значимых различий по массе органов между животными, получавшими тестируемый препарат в двух различных дозах, и контрольными животными, получавшими носитель, на 29-й день исследования выявлено не было. В процессе проведения микроскопического анализа гистологических

образцов внутренних органов животных не было выявлено повреждений гистоструктуры органов.

В ходе проведенного исследования признаков токсичности, связанных с действием тестируемого препарата, не наблюдалось. Статистически значимых различий между животными, получавшими тестируемый препарат в двух экспериментальных дозах, и контрольными животными по приросту веса тела и потреблению корма выявлено не было. На основании проведенного исследования было сделано заключение о том, что лекарственное средство на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы при многократном внутривенном введении самцам и самкам кроликов не вызывает явных токсических эффектов, является безопасным в диапазоне терапевтических доз и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований.

Результаты доклинического исследования подострой токсичности на кроликах свидетельствуют о том, что тестируемый препарат не вызывает токсических эффектов в отношении кроликов в дозе, эквивалентной человеческой терапевтической, с учетом пересчета для данного вида.

На основании проведенного исследования может быть сделано заключение о том, что лекарственное средство на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы при многократном внутривенном введении не вызывает токсических эффектов, является безопасным в диапазоне терапевтических доз и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований.

Токсикологические исследования подострой (субхронической) токсичности лекарственного средства при его внутрибрюшинном введении у крыс

Начиная с 1-го дня исследования у всех животных, как самцов, так и самок, получавших максимальную дозу тестируемого препарата (90 мг/кг), наблюдались признаки дискомфорта в брюшной полости, сторбленность, снижение подвижности, поджатие пальцев задних лап, нарушение походки. Описанные признаки наблюдались в течение суток после введения и не наблюдались на следующий день.

При ежедневном осмотре животных в клетках содержания гибели животных не наблюдалось. Самка № 55 из группы, получавшей тестируемый пептид в дозе 10 мг/кг, была подвергнута досрочной некропсии на 8-й день исследования с признаками перитонита и в связи с прогрессирующим ухудшением состояния. В таблице 6 представлены данные о массе тела животных и приросте их массы тела.

Таблица 6 – Масса тела и прирост массы тела животных

	0,9% NaCl		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 10 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 30 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 90 мг/кг	
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Самцы								
День 1, масса тела, г	173±9	12	173±8	12	179±15	12	172±7	12
День 7, масса тела, г	209±9	12	208±10	12	209±9	12	202±10	12
День 14, масса тела, г	249±9	12	249±12	12	247±15	12	237±11	12
День 7, прирост, %	20,8 ± 2,5	12	20,4 ± 2,0	12	17,0 ± 8,3	12	17,8 ± 2,2*	12
День 14, прирост, %	44,4 ± 4,7	12	44,0 ± 3,9	12	38,3 ± 10,4	12	38,1 ± 3,4*#	12
Самки								
День 1, масса тела, г	151±11	12	152±10	12	152±11	12	149±13	12
День 7, масса тела, г	169±11	12	166±9	12	164±12	12	164±13	12
День 14, масса тела, г	185±8	12	183±10	11	181±11	12	178±11	12
День 7, прирост, %	12,0 ± 3,2	12	9,7 ± 8,9	12	8,1 ± 5,9	12	10,0 ± 2,9	12
День 14, прирост, %	22,8 ± 6,0	12	22,0 ± 7,2	11	19,3 ± 5,8	12	19,2 ± 6,1	12

* - $P < 0,05$ на основании критерия Kruskal-Wallis относительно группы, получавшей 0,9% NaCl; # - $P < 0,05$ на основании критерия Kruskal-Wallis относительно группы, получавшей Ингибитор RAS-ГТФ-азы в дозе 10 мг/кг

У самцов, получавших тестируемый пептид в дозе 90 мг/кг, наблюдалось статистически значимое снижение прироста массы тела относительно животных,

получавших 0,9% NaCl (на 7-й и 14-й дни исследования), а также относительно группы животных, получавших тестируемый пептид в дозе 10 мг/кг (14-й день исследования). У самок наблюдалась аналогичная тенденция к снижению прироста массы тела, не достигавшая статистической значимости.

К 14-му дню исследования у самцов, получавших тестируемый пептид в дозе 90 мг/кг, наблюдалось статистически значимое снижение потребления корма относительно животных, получавших 0,9% NaCl. У самок при введении дозы 90 мг/кг наблюдалась аналогичная тенденция, однако снижение потребления корма не было статистически значимым (Таблица 7).

Таблица 7 – Потребление корма животными

	0,9% NaCl		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 10 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 30 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 90 мг/кг	
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Самцы								
День 6-7, г/кг/сут	101,9 ± 5,1	6	104,2 ± 5,6	6	106,6 ± 4,2	6	102,4 ± 2,0	6
День 13-14, г/кг/сут	90,0 ± 4,5	6	88,2 ± 5,6	6	88,0 ± 3,6	6	73,9 ± 6,6*	6
Самки								
День 6-7, г/кг/сут	92,9 ± 3,4	6	95,6 ± 16,0	6	92,1 ± 4,3	6	90,0 ± 3,4	6
День 13-14, г/кг/сут	84,5 ± 3,4	6	82,4 ± 6,1	6	84,8 ± 16,9	6	74,6 ± 16,3	6

* - $P < 0,05$ на основании критерия *Kruskal-Wallis* относительно группы, получавшей 0,9% NaCl.

Анализ параметров локомоторной активности, сердечно-сосудистой и дыхательной систем животных, получавших тестируемый пептид в исследуемых дозах, не выявил статистически значимых межгрупповых различий на 24-й день исследования.

Ни у самцов, ни самок крыс не было обнаружено статистически значимых изменений показателей гемостаза относительно животных, получавших контрольное вещество (0,9% NaCl), на 17-й день исследования.

У крыс обоего пола, получавших пептидный ингибитор Ras-ГТФ-азы в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг и 90 мг/кг, по окончании курса введения не было выявлено статистически значимых отклонений в показателях гемограммы относительно уровня контрольной группы, получавшей 0,9% NaCl. У самцов, получавших тестируемый пептид, отмечалась слабая тенденция к лейкоцитозу за счет абсолютного лимфоцитоза независимо от дозы препарата. У самок такой эффект наблюдался только при введении дозы 10 мг/кг.

В ходе биохимического анализа сыворотки крови на 17-й день исследования у самцов, получавших ингибитор RAS-ГТФ-азы в дозе 10 мг/кг, было выявлено статистически значимое повышение уровня мочевины относительно контрольной группы, получавшей 0,9% NaCl. Однако наблюдаемые изменения показателей не были дозозависимыми, поэтому не могут однозначно считаться связанным с действием тестируемого пептида.

Как у самцов, так и у самок крыс не было выявлено статистически значимых изменений в изученных показателях диуреза и общеклинического анализа мочи относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор, на 17-й день исследования.

В ходе плановой некропсии на 17-й день исследования (Таблица 8) у ряда животных независимо от группы и вводимой дозы тестируемого пептида наблюдалось изменение цвета тимуса и подчелюстных лимфоузлов, уменьшение надпочечников в размерах, деформация почек, не связанные с введением тестируемого пептида. У ряда животных, получавших Ингибитор RAS-ГТФ-азы, при введении всех трех доз наблюдались признаки перитонита. Проявление и частота встречаемости данных признаков не носила дозовой зависимости, однако учитывая, что они не наблюдались у животных контрольной группы, нельзя исключать связь их возникновения с введением тестируемого пептида.

Как у самцов, так и у самок крыс не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий абсолютной и относительной массы органов на 17-й день исследования (Таблица 9). Исключение составило увеличение относительной и абсолютной массы надпочечников у самцов на 17-й день в

группе, получавшей тестируемый пептид в дозе 30 мг/кг, относительно контрольной группы. При введении дозы 90 мг/кг наблюдалась аналогичная тенденция к увеличению массы надпочечников, не имеющая статистической значимости.

Таблица 8 – Результаты некропсии, 17-й день

Орган Описание изменения	Количество животных с изменением (номера животных с указанными изменениями)			
	0,9% NaCl	Ингибитор RAS-ГТФ- азы 10 мг/кг	Ингибитор RAS-ГТФ- азы 30 мг/кг	Ингибитор RAS-ГТФ- азы 90 мг/кг
Надпочечники Уменьшение в размерах	1♂ (№ 2)	1♂ (№ 9)	-	-
Тимус Изменение цвета на красный	1♀ (№ 49)	-	-	1♀ (№ 68)
Тимус Уменьшение в размерах	-	-	-	1♀ (№ 68)
Почки Деформация	2♂ (№ 2,5) 1♀ (№ 51)	-	-	1♂ (№ 22) 1♀ (№ 67)
Подчелюстные лимфоузлы. Изменение цвета на красный	1♀ (№ 54)	2♂ (№№ 8,9)	-	-
ДИАРЕЯ	-	-	-	1♀ (№ 68)
КИШЕЧНИК (слепая кишка). Спаечный процесс, перитонит, асцит	-	1♀ (№ 55) досрочная некропсия	2♀ (№ 63,64)	1♀ (№ 68)

В целях сравнения показателей независимо от их значений и принятия обоснованных решений на основе сравнительных характеристик, был проведен анализ относительных значений масс органов животных после 6-кратного введения в течение 16 дней пептидного ингибитора RAS-ГТФ-азы Инг-Рас (K26K) (Таблица 10).

Таблица 9 – Масса органов животных (абсолютные значения), 17-й день

Самцы	0,9% NaCl		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 10 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 30 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 90 мг/кг	
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Семенники, г.	3,047 ± 0,161	6	3,134 ± 0,295	6	2,996 ± 0,141	6	2,973 ± 0,124	6
Селезенка, г.	0,738 ± 0,105	6	0,772 ± 0,108	6	0,673 ± 0,057	6	0,653 ± 0,041	6
Почки, г.	1,924 ± 0,060	6	1,916 ± 0,144	6	1,912 ± 0,212	6	1,819 ± 0,200	6
Надпочечники, г.	0,0375 ± 0,0023	6	0,0398 ± 0,0060	6	0,0440 ± 0,0042*	6	0,0415 ± 0,0029	6
Печень, г.	8,07 ± 0,34	6	8,30 ± 0,65	6	7,83 ± 0,33	6	7,52 ± 0,26	6
Тимус, г.	0,572 ± 0,069	6	0,600 ± 0,105	6	0,656 ± 0,076	6	0,510 ± 0,067	6
Сердце, г.	0,920 ± 0,071	6	0,935 ± 0,094	6	0,918 ± 0,090	6	0,843 ± 0,074	6
Легкие, г.	1,117 ± 0,055	6	1,125 ± 0,088	6	1,118 ± 0,078	6	1,053 ± 0,065	6
Головной мозг, г.	1,696 ± 0,047	6	1,732 ± 0,048	6	1,652 ± 0,078	6	1,630 ± 0,052	6
Самки	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Яичники, г.	0,1255 ± 0,0146	6	0,1312 ± 0,0199	5	0,1252 ± 0,0178	6	0,1134 ± 0,0180	6
Селезенка, г.	0,567 ± 0,093	6	0,541 ± 0,042	5	0,705 ± 0,170	6	0,570 ± 0,137	6
Почки, г.	1,350 ± 0,051	6	1,342 ± 0,068	5	1,363 ± 0,100	6	1,263 ± 0,138	6
Надпочечники, г.	0,0501 ± 0,0054	6	0,0512 ± 0,0023	5	0,0510 ± 0,0058	6	0,0517 ± 0,0055	6
Печень, г.	5,58 ± 0,39	6	5,85 ± 0,55	5	5,84 ± 0,58	6	5,93 ± 0,83	6
Тимус, г.	0,388 ± 0,058	6	0,425 ± 0,066	5	0,410 ± 0,071	6	0,304 ± 0,094	6
Сердце, г.	0,662 ± 0,034	6	0,683 ± 0,050	5	0,682 ± 0,048	6	0,623 ± 0,064	6
Легкие, г.	0,906 ± 0,057	6	0,927 ± 0,073	5	0,902 ± 0,071	6	0,864 ± 0,066	6
Головной мозг, г.	1,606 ± 0,043	6	1,592 ± 0,075	5	1,573 ± 0,044	6	1,546 ± 0,034	6

* - $P < 0,05$ на основании критерия Kruskal-Wallis относительно группы, получавшей 0,9% NaCl

Таблица 10 – Масса органов животных (относительные значения), 17-й день

Самцы	0,9% NaCl		Ингибитор RAS- ГТФ-азы 10 мг/кг		Ингибитор RAS- ГТФ-азы 30 мг/кг		Ингибитор RAS-ГТФ-азы 90 мг/кг	
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Семенники, %	1,318 ± 0,048	6	1,327 ± 0,075	6	1,316 ± 0,084	6	1,358 ± 0,026	6
Селезенка, %	0,319 ± 0,039	6	0,327 ± 0,035	6	0,295 ± 0,020	6	0,299 ± 0,021	6
Почки, %	0,833 ± 0,025	6	0,812 ± 0,030	6	0,837 ± 0,065	6	0,830 ± 0,075	6
Надпочечники, %	0,0163 ± 0,0014	6	0,0168 ± 0,0021	6	0,0192 ± 0,0012*	6	0,0190 ± 0,0012	6
Печень, %	3,491 ± 0,098	6	3,515 ± 0,119	6	3,436 ± 0,083	6	3,436 ± 0,065	6
Тимус, %	0,2480 ± 0,0327	6	0,2570 ± 0,0560	6	0,2874 ± 0,0296	6	0,2327 ± 0,0299	6
Сердце, %	0,399 ± 0,042	6	0,396 ± 0,023	6	0,402 ± 0,025	6	0,384 ± 0,026	6
Легкие, %	0,484 ± 0,033	6	0,477 ± 0,027	6	0,490 ± 0,022	6	0,481 ± 0,019	6
Головной мозг, %	0,735 ± 0,041	6	0,736 ± 0,039	6	0,725 ± 0,035	6	0,745 ± 0,030	6
Самки	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Яичники, %	0,0739 ± 0,0087	6	0,0796 ± 0,0111	5	0,0759 ± 0,0087	6	0,0702 ± 0,0127	6
Селезенка, %	0,334 ± 0,051	6	0,329 ± 0,028	5	0,429 ± 0,104	6	0,350 ± 0,078	6
Почки, %	0,795 ± 0,045	6	0,815 ± 0,048	5	0,829 ± 0,063	6	0,777 ± 0,041	6
Надпочечники, %	0,0295 ± 0,0026	6	0,0311 ± 0,0024	5	0,0309 ± 0,0019	6	0,0319 ± 0,0037	6
Печень, %	3,287 ± 0,247	6	3,551 ± 0,312	5	3,549 ± 0,356	6	3,656 ± 0,472	6
Тимус, %	0,2289 ± 0,0373	6	0,2571 ± 0,0321	5	0,2496 ± 0,0470	6	0,1856 ± 0,0514	6
Сердце, %	0,389 ± 0,011	6	0,414 ± 0,025	5	0,413 ± 0,008	6	0,384 ± 0,022	6
Легкие, %	0,533 ± 0,031	6	0,563 ± 0,040	5	0,549 ± 0,046	6	0,533 ± 0,039	6
Головной мозг, %	0,946 ± 0,041	6	0,967 ± 0,039	5	0,957 ± 0,046	6	0,957 ± 0,080	6

* - $P < 0,05$ на основании критерия *Kruskal-Wallis* относительно группы, получавшей 0,9% NaCl

Таким образом, на основании проведенного исследования безопасности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России) при его многократном внутривенном введении самцам и самкам крыс SD один раз в три дня в течение 16 дней с последующим 14-дневным периодом отмены в трех экспериментальных дозах можно сделать вывод: исследуемое лекарственное средство не обладает выраженным общетоксическим действием в использованных дозах. Наблюдаемые незначительные отклонения некоторых показателей от значений в контрольной группе не имели дозовой зависимости и регистрировались, начиная с минимальной дозы. Однако учитывая, что они не наблюдались у животных контрольной группы, нельзя исключать связь их возникновения с введением тестируемого пептида.

При введении исследуемого пептида в максимальной дозе наблюдались признаки местно раздражающего действия, регистрируемые в ходе клинического осмотра.

В результате оценки фармакологической безопасности тестируемого препарата может быть сделано заключение об отсутствии нежелательных побочных эффектов в отношении ЦНС, сердечно-сосудистой и дыхательной систем у крыс при введении тестируемого пептида в дозах от 10 до 90 мг/кг.

4.5 Изучение мутагенного потенциала

Исследование мутагенности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы проведено в двух тестах. В первом оценивали потенциальную цитогенетическую активность препарата в микроядерном тесте на эритроцитах костного мозга при однократном внутривенном введении в одной экспериментальной дозе мышам линии CD-1; во втором — мутагенную активность по способности к индукции прямых мутаций при введении в культуру клеток *in vitro* в различных дозах от 2,3 мкг до 2000 мкг тестируемого препарат на 1 мл стандартной питательной среды.

4.5.1 Исследование потенциальной цитогенетической активности лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы в микроядерном тесте

В ходе исследования у животных регистрировали массу тела и общее состояние здоровья. Животные были подвергнуты эвтаназии через 24 часа после введения веществ. В конце исследования животных помещали в CO₂-камеру до потери сознания и остановки дыхания.

У всех животных выделяли костный мозг из бедренной кости и готовили мазки для анализа. В мазках анализировали полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) на наличие микроядер, а также подсчитывали соотношение между полихроматофильными (ПХЭ) и зрелыми эритроцитами. Критерием позитивного результата являлось воспроизводимое и статистически значимое увеличение числа ПХЭ с микроядрами в любой опытной группе. Статистический анализ проводили для животных каждого пола отдельно. Положительный результат свидетельствовал о том, что вещество индуцирует структурные повреждения хромосом у экспериментальных животных.

В группах мышей обоего пола, получивших однократно внутривенно исследуемый препарат - ингибитор Ras-ГТФазы в дозе 35 мг/кг, не было выявлено статистически значимого увеличения частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами по сравнению с одновременным отрицательным контролем (носитель). В группах самцов, получивших носитель (отрицательный контроль) и ингибитор Ras-ГТФазы, отмечалась достоверная разница в количестве ПХЭ с микроядрами по сравнению с животными, получившими однократно внутрибрюшинно Циклофосфамид 50 мг/кг (положительный контроль). У самок достоверное отличие в количестве микроядерных эритроцитов относительно положительного контроля наблюдалось только в группе носителя.

Таким образом, результаты микроядерного теста на полихроматофильных эритроцитах костного мозга с целью исследования мутагенности препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при его однократном внутривенном

введении мышам в дозе 35 мг/кг являются отрицательными. Лекарственное средство на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при его однократном внутривенном введении мышам в дозе 35 мг/кг не вызывает мутагенного эффекта.

4.5.2 Исследование мутагенности лекарственного средства пептидного ингибитора Ras-ГТФазы по его способности производить генные мутации в клетках млекопитающих в условиях *in vitro*

Первый этап исследования включал определение цитотоксичности доз препарата, для этого во всех группах после обработки культур определялась цитотоксичность воздействующих доз. Это проводилось для того, чтобы исключить группы с избыточным цитотоксическим действием с целью исключения ложноотрицательного результата. Так, было определено, что оба варианта воздействия максимальной выбранной дозы ингибитора RAS-ГТФазы обладают цитотоксичностью более 90%. Поэтому они были исключены из дальнейших расчетов. Все остальные группы были далее использованы для определения частоты мутаций.

Второй этап включал определение частоты возникновения мутаций в гене HPRT под воздействием различных концентраций исследуемого препарата от 2,3 мкг до 2000 мкг тестируемого препарат на 1 мл стандартной питательной среды. Все группы, цитотоксичность в которых не превышала 90%, были исследованы на предмет возникновения прямых мутаций. Для этого каждый вариант высевался как на среду с селективным агентом, так и без него. Культивирование продолжалось 7 суток. По окончании периода культивирования все варианты фиксировались и окрашивались.

Количество образовавшихся колоний подсчитывалось визуально. Были рассчитаны частоты мутаций. Относительно варианта «Контроль культивирования» были выявлены статистически значимые увеличения частоты мутаций всех положительных контролей. Это подтверждает приемлемость всех полученных в тесте результатов. Во всех группах с обработкой тестируемым веществом не найдено статистически значимых различий по сравнению с группой

отрицательного контроля «Контроль культивирования». Так же не выявлено тренда дозозависимого увеличения количества спонтанных мутаций.

Результаты теста на образование прямых мутаций в гене *HPRT* в культуре клеток млекопитающих CHO-k1 в условиях *in vitro* под воздействием препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при его однократном применении в различных дозах являются отрицательными. В ходе исследования было установлено, что все дозы тестируемого препарата, не оказывающие избыточной цитотоксичности, не вызывают увеличения частоты возникновения прямых мутаций в гене *HPRT* в клетках млекопитающих CHO-k1 в условиях *in vitro*.

Таким образом, в результате проведения микроядерного теста на полихроматофильных эритроцитах костного мозга с целью определения мутагенных свойств препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при его однократном внутривенном введении мышам в дозе 35 мг/кг, а также теста на способность к индукции прямых мутаций при введении в культуру клеток *in vitro* в различных дозах от 2,3 мкг до 2000 мкг тестируемого препарат на 1 мл стандартной питательной среды мутагенного эффекта тестируемого препарата (пептидного ингибитора Ras-ГТФазы) не выявлено.

4.6 Изучение алергизирующих свойств

Доклинические исследования алергенности лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы включали оценку алергизирующего действия регистрацией реакции общей анафилаксии на морских свинках, постановкой реакции иммунных комплексов, методом конъюнктивальной пробы и методом непрямой дегрануляции тучных клеток.

4.6.1. Оценка алергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы регистрацией реакции общей анафилаксии на морских свинках

Проведена оценка вероятности развития алергической реакции на введение лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы морским свинкам по развитию реакции общей анафилаксии.

В процессе исследования гибели животных не наблюдалось. Сенсibilизация тестируемым препаратом переносилась животными хорошо: клинически значимых признаков интоксикации организма ни в одной из групп не обнаруживалось. Тестирование вероятности развития аллергической реакции на введение исследуемого препарата морским свинкам по развитию реакции общей анафилаксии после введения разрешающей дозы не выявило признаков развития аллергической реакции. Шок не развивался, отклонений в состоянии здоровья на протяжении суток не наблюдалось. Статистически значимых межгрупповых различий, по показателю «масса тела», при формировании групп выявлено не было.

В результате проведенного исследования по изучению алергизирующего действия в тесте «реакция общей анафилаксии» препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, установлено отсутствие у тестируемого препарата алергизирующего действия, проявляющегося в виде развития общей анафилактической реакции.

4.6.2. Оценка алергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы постановкой реакции иммунных комплексов на морских свинках

В ходе оценки (постановка реакции иммунных комплексов) вероятность развития аллергической реакции на введение лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы гибель животных (морские свинки) не была зарегистрирована.

Сенсibilизация тестируемым препаратом переносилась животными хорошо: клинически значимых признаков интоксикации организма ни в одной из групп не обнаруживалось. Введение разрешающей дозы препарата негативных последствий не вызывало.

Тестирование вероятности развития аллергической реакции на введение исследуемого препарата морским свинкам постановкой реакции иммунных комплексов не выявило признаков развития аллергической реакции. Не было

зарегистрировано отека и гиперемии кожи в области инъекции через 1, 24 и 48 ч после введения разрешающей дозы препарата. В результате проведенного исследования по изучению аллергизирующего действия в тесте «реакция иммунных комплексов» препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, было установлено:

– отсутствие у тестируемого препарата аллергизирующего действия, проявляющегося в виде гиперчувствительности немедленного типа;

– отсутствие у тестируемого препарата аллергизирующего действия, проявляющегося в виде гиперчувствительности замедленного типа.

4.6.3. Оценка аллергизирующего действия лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы методом конъюнктивальной пробы на морских свинках и крысах

Оценка аллергизирующего действия методом конъюнктивальной пробы на морских свинках

В процессе исследования гибели животных не наблюдалось. Сенсibilизация тестируемым препаратом переносилась животными хорошо: клинически значимых признаков интоксикации организма ни в одной из групп не обнаруживалось. Введение разрешающей дозы препарата негативных последствий не вызывало. Результаты теста «конъюнктивальная проба» свидетельствуют об отсутствии у тестируемого препарата аллергизирующего действия: покраснения конъюнктивальной оболочки, склеры или слезного протока ни в одном из периодов мониторинга выявлено не было.

Оценка аллергизирующего действия методом конъюнктивальной пробы на крысах

Отклонений в процедуре введения, влияющих на результаты исследования, не было. Сенсibilизация тестируемым препаратом переносилась животными хорошо: клинически значимых признаков интоксикации организма ни в одной из групп не обнаруживалось. Введение разрешающей дозы препарата негативных последствий не вызывало. Результаты теста «конъюнктивальная проба»

свидетельствуют об отсутствии у тестируемого препарата аллергизирующего действия: покраснения конъюнктивальной оболочки, склеры или слезного протока ни в одном из периодов мониторинга выявлено не было.

В результате проведенного исследования по изучению аллергизирующего действия в тесте «конъюнктивальная проба» на крысах и морских свинках препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, было установлено:

– отсутствие у тестируемого препарата аллергизирующего действия, проявляющегося в виде гиперчувствительности немедленного типа;

– отсутствие у тестируемого препарата аллергизирующего действия, проявляющегося в виде гиперчувствительности замедленного типа.

Исследование аллергенности методом непрямой дегрануляции тучных клеток на морских свинках

В исследовании были использованы 30 гладкошерстных морских свинок в возрасте 14 недель в трех экспериментальных группах по 5 самцов и 5 самок в каждой. Отклонений в процедуре введения, влияющих на результаты исследования, не было. В процессе исследования гибели животных не наблюдалось. Сенсибилизация тестируемым препаратом переносилась животными хорошо: клинически значимых признаков интоксикации организма ни в одной из групп не обнаруживалось. Статистически значимых межгрупповых различий, по показателю «масса тела», при формировании групп выявлено не было.

Значения измеряемых показателей в опытных группах достоверно не отличались от значений в контрольной группе. Тестирование вероятности развития аллергической реакции на введение исследуемого препарата морским свинкам методом непрямой дегрануляции тучных клеток не выявило признаков развития аллергической реакции.

Таким образом, проведенные исследования специфической токсичности показали отсутствие специфических токсических эффектов лекарственного средства - пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K).

4.7. Изучение иммуотоксических свойств

В данном исследовании определялась токсичность в отношении иммунной системы лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при его многократном внутривенном введении самцам мышей-гибридов C57Bl/6xСВА.

На протяжении всего исследования ни в одной экспериментальной группе гибели животных не было, при ежедневном рутинном осмотре отклонений в состоянии здоровья не наблюдалось. На 6-й день после сенсibiliзирующей инъекции никаких клинических признаков отклонений в состоянии здоровья мышей зарегистрировано не было. Значимых изменений массы тела и прироста массы тела животных для всех исследуемых групп получено не было.

При постановке реакции ГЗТ было показано отсутствие достоверных изменений показателей индекса реакции ГЗТ у животных опытных групп, получавших тестируемый препарат в дозе, эквивалентной терапевтической для человека, и дозе, превышающей терапевтическую в два раза, по сравнению с контрольной группой. Индексы реакций гиперчувствительности замедленного типа на введение 10 мМ раствор тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа на ТНБС

Группа	№1	№2	№3
	физраствор	Ингибитор Ras-ГТФазы, 16,8 мг/кг	Ингибитор Ras-ГТФазы, 33,6 мг/кг
Индекс реакции ГЗТ, %	9.5 ± 7.2 (n=10)	11.7 ± 7.2 (n=10)	15.3 ± 10.1 (n=10)

В тесте 2 при оценке иммунного ответа на введение стандартного антигена — бычьего сывороточного альбумина (БСА) — не выявлено достоверных изменений оптической плотности, характеризующей уровень IgG-антител к БСА в сыворотке крови у животных опытных групп. Животные получали тестируемый

препарат в дозе, эквивалентной терапевтической для человека, а также в дозе, превышающей терапевтическую в два раза, по сравнению с контрольной группой.

При оценке функциональной активности нейтрофилов в тесте с нитротетразолевым синим (НСТ-тест) была проведена оценка индивидуальных значений оптической плотности супернатанта клеток перитонеального экссудата мышей без добавления зимозана (Zm-, показатель спонтанной продукции перекисных радикалов) и с добавлением опсонизированного зимозана (Zn+, показатель индуцированной продукции перекисных радикалов), средние значения показателей представлены в Таблице 12. Было показано, что достоверные изменения показателей активности нейтрофилов у животных опытных групп, получавших тестируемый препарат, по сравнению с контрольной группой отсутствуют.

Таблица 12 – Оптическая плотность супернатанта клеток перитонеального экссудата как показатель продукции перекисных радикалов

Группа	№7	№8	№9
	физраствор	Ингибитор Ras-ГТФазы, 16,8 мг/кг	Ингибитор Ras-ГТФазы, 33,6 мг/кг
Оптическая плотность Zm-	0.019 ± 0.015 (n=10)	0.019 ± 0.021 (n=10)	0.025 ± 0.026 (n=10)
Оптическая плотность Zm+	0.054 ± 0.028 (n=10)	0.047 ± 0.026 (n=10)	0.043 ± 0.018 (n=10)

В результате исследования иммунотоксичности тестируемого препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы не выявлено достоверных изменений показателей иммунной системы. Оценка проводилась по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), иммунному ответу на стандартный антиген и функциональной активности нейтрофилов при дозах, эквивалентной терапевтической для человека, и превышающей её в 2 раза.

4.8. Изучение местно-раздражающих свойств

Гистологическое исследование токсических эффектов пептидного ингибитора Ras-ГТФазы проведено в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России при его многократном внутрибрюшинном введении самцам и самкам крыс линии SD один раз в три дня в течение 16 дней с последующим 14-дневным периодом отмены. Исследование выполнено в трех экспериментальных дозах.

Препарат проявил местно-раздражающее действие при 6-кратном введении в дозе 90 мг/кг. Это действие характеризовалось утолщением и слабовыраженной мононуклеарной инфильтрацией серозной оболочки подвздошной кишки (у единичных животных) и слепой кишки (у половины самцов и единичных самок), а также утолщением и уплотнением капсулы поджелудочной железы с ее мононуклеарной инфильтрацией (у всех самцов и самок) и локальным утолщением капсулы печени (у единичных самцов и половины самок).

В единичном случае после шестикратного (по одному разу в три дня в течение 16 дней) внутрибрюшинного введения тестируемого препарата самкам крыс в дозе 90 мг/кг наблюдались явления очагового перитонита с тотальным некрозом стенки подвздошной и слепой кишки, утолщением и слабовыраженной мононуклеарной инфильтрацией серозной оболочки тощей и ободочной кишки, а также резко выраженная акцидентальная (стрессовая) инволюция тимуса с тотальной редукцией числа лимфоидных клеток и стиранием гистологической картины органа, выраженная атрофия белой пульпы селезенки и усиленный экстрамедуллярный гемопоэз в красной пульпе этого органа.

В остальных органах и тканях не обнаружено каких-либо патогистологических изменений, указывающих на токсическое действие тестируемого препарата в указанной дозе при многократном внутрибрюшинном введении самцам и самкам крыс SD.

4.9. Изучение пирогенности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K)

В исследование было включено 6 Кроликов (*Oryctolagus sp.*) Калифорнийской породы. Данное исследование было направлено на выявление пирогенного эффекта тестируемого препарата при его однократном внутривенном введении в дозе 4,5 мг/кг, соответствующей максимальной терапевтической для человека.

Перед опытом у каждого кролика дважды с интервалом в 30 мин измеряли температуру. Исходная температура находилась в диапазоне 38,5 - 39,5°C. Лекарственное средство вводили животным не позднее, чем через 15 мин после последнего измерения температуры внутривенно в дозе 4,5 мг/кг. Перед введением лекарственное средство нагревали на водяной бане до 37 °С. Измерения температуры проводили через 30, 90, 150 и 180 мин после внутривенного введения.

Отклонений в процедуре введения, влияющих на результаты исследования, выявлено не было. В процессе исследования гибели животных не наблюдалось. Тестирование пирогенных свойств исследуемого препарата на кроликах не выявило изменений температуры тела экспериментальных животных, которое свидетельствовало бы о развитии пирогенной реакции.

В результате проведенного исследования препарата на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, установлено отсутствие у тестируемого препарата пирогенного действия, проявляющегося в виде повышения температуры тела экспериментальных животных.

Таким образом, на основании полученных результатов может быть сделано заключение о том, что тестируемый препарат в исследуемой дозе при данном режиме введения пирогенностью не обладает.

4.10. Доклинические исследования фармакокинетики лекарственного средства на основе пептидного ингибитора RAS-ГТФазы (K26K)

В ходе работы изучалась фармакокинетика лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы при его внутривенном введении

самцам крыс (линия Sprague-Dawley (SD)) и кроликов (калифорнийская порода) в трех экспериментальных дозах.

Ежедневно проводили осмотр всех животных в клетках содержания с целью выявления смертности или признаков отклонения в состоянии здоровья. Животных взвешивали при формировании групп и непосредственно перед введением препаратов.

Сбор проб крови осуществляли из ушной вены у кроликов в объеме около 1,5 мл. У крыс кровь собирали из предварительно имплантированного в сонную артерию катетера в объеме около 0,5 мл. Образцы крови собирали в пробирки с K3-EDTA и хранили на льду сразу после сбора. В течение 30 мин после сбора образцы центрифугировали приблизительно при 4°C и 1500g в течение 15 мин для получения плазмы. Пробирки маркировали с указанием номера исследования, номера животного, временной точки сбора и даты сбора. Образцы хранили при -20°C до момента отправки в биоаналитическую лабораторию.

Анализ содержания пептида в плазме крови проводили с помощью валидированного биоаналитического метода определения Ras-ГТФаза в плазме с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС системы). Валидация методики включала в себя определение точности и правильности в течение двух независимых серий анализа. Для всех калибровочных стандартов и контрольных образцов отклонения от номинальной концентрации (правильность) не превышали 15%. Значения точности составляли не более 15%, что демонстрирует высокую воспроизводимость метода. Исследование стабильности Ras-ГТФаза (Ras) показало, что препарат стабилен в плазме при 2-кратном размораживании/замораживании. Сток-раствор стабилен при 3-кратном размораживании/замораживании в 5 мМ ацетате аммония. Пост-препаративная стабильность растворов Ras-ГТФаза (Ras) в автосамплере в течение суток при 4°C не выявила деградации соединения.

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанного метода делают его пригодным для количественного определения Ras-ГТФаза

(Ras) в плазме крови при исследовании фармакокинетики при использовании сток-растворов в течение 12 часов и хранении их и исследуемых образцов в плазме при 4°C.

После введения ингибитора RAS-ГТФ-азы в крови крыс концентрация начинала плавно снижаться и через час после введения определялась в плазме крови в минимальных количествах (на уровне 0,01-0,05 мкг/мл). Через 2 часа концентрации вещества в плазме крови составили менее 0,01 мкг/мл. Разброс индивидуальных значений умеренный: коэффициент вариации CV составил 5–33% (до 100% в точке 1 час).

После введения ингибитора RAS-ГТФ-азы в крови кроликов концентрация начинала плавно снижаться и через час после введения определялась в плазме крови в минимальных количествах (на уровне 0,01-0,10 мкг/мл). Через 2 часа концентрации вещества в плазме крови составили менее 0,01 мкг/мл. Разброс индивидуальных значений умеренный: коэффициент вариации CV составил 2–40%. Расчет фармакокинетических показателей выполнен модельно-независимым (прямым) способом на основе метода интегральных моментов. Рассчитанные значения показателей приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Фармакокинетические показатели субстанции ингибитора RAS-ГТФ-азы плазме крови крыс и кроликов

Группа/доза	C_{max} (мкг/мл)	$AUC_{(0 \rightarrow 1)}$ (час*мкг/мл)	$AUC_{(0 \rightarrow 8)}$ (час*мкг/мл)	Cl (л/ч*кг)	AUMC (час ² *нг/мл)	MRT (мин)	V_0 (мл/кг)	V_{ss} (мл/кг)	$T_{1/2}$ (мин)
Крысы, 15 мг/кг	160,71	13,31	13,32	1,13	1,06	4,78	93,3	89,7	4,58
Крысы, 50 мг/кг	468,02	37,81	37,82	1,32	2,94	4,67	106,8	102,8	4,18
Кролики, 15 мг/кг	180,63	17,31	17,35	0,86	1,69	5,87	83,0	84,5	5,25
Кролики, 50 мг/кг	591,78	56,04	56,08	0,89	5,39	5,77	84,5	85,7	4,63

Примечание – обозначения таблицы:

C_{max} — максимальная концентрация;

$AUC_{(0 \rightarrow 1)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время», к 1 часу;

$AUC_{(0 \rightarrow 8)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время», к 8 часам;

Cl — клиренс;

$AUMC_{(0 \rightarrow t)}$ — площадь под фармакокинетической кривой,

MRT — среднее время пребывания в организме;

V_0 — центральный объем распределения;

V_{ss} — стационарный объем распределения;

$T_{1/2}$ — время полувыведения

Полученные результаты позволили сделать ряд выводов о фармакокинетике ингибитора RAS-ГТФ-азы при внутривенном способе введения у крыс и кроликов.

Концентрация ингибитора RAS-ГТФ-азы в плазме крови крыс, определяемая через 1 минуту составляет порядка 180 мкг/мл (184 ± 12) при дозе 15 мг/кг и 460 мкг/мл (462 ± 28) при дозе 50 мг/кг. Снижение концентрации характеризуется временем половинного убывания порядка 4-5 минут (4,58 минуты при дозе 15 мг/кг, 4,18 минуты при дозе 50 мг/кг). Общее среднее время присутствия препарата в организме — показатель MRT составляет порядка 5 мин. Величина кажущегося стационарного объема распределения — показатель V_{ss} — составляет порядка 90-100 мл/кг (89,7 мл/кг при дозе 15 мг/кг, 102,8 мл/кг при дозе 50 мг/кг).

Концентрация ингибитора RAS-ГТФ-азы в плазме крови кроликов, определяемая через 1 минуту составляет порядка 160 мкг/мл (159 ± 10) при дозе 15 мг/кг и 590 мкг/мл (589 ± 15) при дозе 50 мг/кг. Снижение концентрации характеризуется временем половинного убывания порядка 4-5 минут (5,25 минут при дозе 15 мг/кг, 4,63 минуты при дозе 50 мг/кг). Общее среднее время присутствия препарата в организме — показатель MRT составляет порядка 6 мин. Величина кажущегося стационарного объема распределения — показатель V_{ss} — составляет порядка 80-85 мл/кг (83,0 мл/кг при дозе 15 мг/кг, 84,5 мл/кг при дозе 50 мг/кг).

В экспериментальных работах по исследованию противоопухолевой эффективности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы было показано, что исследуемый пептид обладает цитотоксическим и цитостатическим свойством в отношении опухолевых клеток различной локализации.

При изучении токсических эффектов при многократном внутривенном введении ингибитора RAS-ГТФазы самцам и самкам крыс один раз в три дня в течение 16 дней с последующим 14-дневным периодом отмены в трех экспериментальных дозах, было выявлено, что исследуемое лекарственное средство не обладает выраженным общетоксическим действием в

использованных дозах (10, 30 и 90 мг/кг). Наблюдаемые незначительные отклонения некоторых показателей от значений в контрольной группе не имели дозовой зависимости и регистрировались, начиная с минимальной дозы. При введении исследуемого пептида в максимальной дозе наблюдались признаки местнораздражающего действия, регистрируемые в ходе клинического осмотра.

Однако учитывая, что они не наблюдались у животных контрольной группы, нельзя исключать связь их возникновения с введением тестируемого пептида. Кроме того, безопасность препарата доказывается практическим отсутствием токсических эффектов со стороны исследованных органов и систем при использовании терапевтических доз.

В результате оценки фармакологической безопасности тестируемого препарата было сделано заключение об отсутствии нежелательных побочных эффектов в отношении ЦНС, сердечно-сосудистой и дыхательной систем у крыс при введении тестируемого пептида в дозах от 10 до 90 мг/кг.

Исходя из результатов, полученных при проведении комплекса доклинических исследований, было принято решение о возможности клинического исследования ингибитора RAS-ГТФазы. Запланированное исследование было предложено провести в формате послеоперационного интраперитонеального введения пептидного ингибитора RAS-ГТФазы при использовании технологии РРАС, что позволит, максимально снизить нецелевое накопление и быстрое выведение почками, а также доставить препарат в области потенциального канцероматоза и диссеминации опухолевых клеток, наблюдаемой в результате хирургического вмешательства.

ГЛАВА 5. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ – ПРЕПАРАТА ИНГ-РАС (результаты собственных исследований)

5.1 Оценка фармакокинетики

Фармакокинетика пептида Инг-РАС оценивалась по результатам I этапа КИ (2022–1–Инг–Рас). Исследование I этапа было проведено на базе одного центра (ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России).

Препарат вводился интраперитонеально (внутрибрюшинно) с помощью внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIRAC) двукратно с интервалом 7 дней. Объем вводимого препарата составлял 150 мл. Дозирование препарата было основано на весе пациента, измеренном утром в день введения препарата. Для Когорты 1 вводимая доза препарата определялась, исходя из расчёта 0,45 мг ИП на 1 кг массы тела пациента; для Когорты 2 – 0,9 мг/кг; для Когорты 3 – 1,8 мг/кг. Переход к следующей дозовой когорте осуществлялся только после оценки безопасности предыдущей расчётной дозы препарата по результатам заседания Независимого Комитета по Мониторингу Данных (НКМД). В 1 когорту (доза ИП – 0,45 мг/кг) было включено – 4 пациента (1 пациент мужского пола, 3 пациента женского пола в возрасте от 38 до 73 лет); во 2 когорту (доза ИП – 0,9 мг/кг) – 3 пациента (2 пациента мужского пола, 1 пациент женского пола в возрасте от 63 до 75 лет); в 3 когорту (доза ИП – 1,8 мг/кг) – 4 пациента (2 пациента мужского пола, 2 пациента женского пола в возрасте от 58 до 75 лет). После первого введения препарата пациент в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки параметров фармакокинетики (в течение первых 12 часов после введения ИП), переносимости и безопасности. Первый отбор образцов крови для определения концентрации препарата Инг-Рас проводился до применения тестируемого препарата. Далее отбор образцов крови проводился после применения исследуемого препарата (по окончании экспозиции) через 5 мин (± 1 мин), 10 мин (± 1 мин), 20 мин (± 1 мин), 30 мин (± 2 мин), 60 мин (± 2 мин), 2 ч (± 2 мин), 4 ч (± 5 мин), 6 ч (± 5 мин), 8 ч (± 10 мин) и 12 ч

(± 10 мин) после окончания инфузии (11 точек). Общий объем крови для определения фармакокинетических параметров для одного пациента составлял 66 мл (11 образцов по 6 мл).

На 8-й день исследования проводилось второе введение препарата с расчётом дозировки, соответствующей текущей когорте. После второго введения препарата пациент также в течение 7 дней находился в стационаре с целью оценки параметров переносимости и безопасности, после чего пациент выписывался из стационара. На 21 (± 1) день пациент совершал амбулаторный визит в исследовательский центр с целью оценки параметров переносимости и безопасности, на 28 (± 1) день пациент совершал амбулаторный визит в исследовательский центр с целью заключительной оценки параметров переносимости и безопасности.

Всего в рамках I этапа в фармакокинетическом исследовании приняли участие 11 пациентов, от которых была получена хотя бы одна проба для фармакокинетического анализа. Всего в ходе исследования был проанализирован 121 образец, полученный от пациентов в рамках клинической части исследования. Забракованных аналитических циклов не было. Во всех образцах концентрация пептида Инг-Рас в плазме крови была ниже предела количественного определения (100 нг/мл). В единичных образцах из третьей когорты (доза 1,8 мг/кг), взятых во временной точке #5 (60 мин) у субъектов 107, 108, 109, 110, 111 и во временной точке # 6 (2 ч) у субъектов 110 и 111 детектировались следовые количества пептидного препарата Инг-Рас.

5.2 Оценка безопасности

Все неблагоприятные события закодированы терминологией MedDRA, актуальной на момент проведения анализа версии. Они представлены предпочтительным термином (PT) и классом системного органа (SOC). По итогам проведённого I этапа представлена таблица частот реакций дозолимитирующей токсичности для каждой из когорт, а также представлено разделение по характеру реакций. Также по итогам проведённого I этапа были рассчитаны частоты всех

нежелательных и серьезных нежелательных явлений, представлены частоты НЯ с разделением по классам и предпочтительным терминам, согласно терминологии MedDRA, по степени тяжести, степени взаимосвязи с применением исследуемого препарата, действиям в отношении пациента и препарата, исходу НЯ. Оценка безопасности проводилась на протяжении всего исследования на популяции всех пациентов, получивших хотя бы одну дозу препарата. Количество пациентов, включенных в оценку безопасности, составило 11 субъектов.

Первичными критериями оценки безопасности были: частота, тип, связь с введением исследуемого препарата и тяжесть нежелательных и серьезных нежелательных явлений (в том числе клинически значимых отклонений лабораторных параметров и результатов инструментальных обследований), которые оценивались по данным жалоб; результатов физикального осмотра; результатов оценки ЧСС, АД, ЧДД; результатов оценки температуры тела; лабораторного мониторинга (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, общий анализ мочи); оценки ЭКГ. Вторичными критериями оценки безопасности были: частота нежелательных явлений, связанных с процедурой РПАС (НЯ, для которых связь с процедурой классифицирована как «определенная» или «вероятная»).

5.2.1 Результаты исследования безопасности в ходе I этапа исследования

Нежелательные явления

В ходе выполнения 1 этапа исследования (фаза Ia) было зарегистрировано 24 НЯ у всех 11 пациентов, принимавших участие в исследовании. В таблице 14 представлены данные по НЯ, сгруппированные по SOC и PT.

Таблица 14 – Общее количество НЯ по SOC и РТ

Группа ->		0.45 мг/кг		0.9 мг/кг		1.8 мг/кг		
SOC	РТ	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	p
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы	Тромбоцитопения	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1.000
Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	Боль в конечности	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1.000
Нарушения со стороны нервной системы	Геморрагический инфаркт головного мозга	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1.000
Общие нарушения и реакции в месте введения	Астения	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1.000
	Гипертермия	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1/6	16.67% [0.42% - 64.12%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	0.723
Травмы, интоксикации и осложнения процедур	Воспаление раны	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1.000
	Процедурная боль	5/9	55.56% [21.2% - 86.3%]	5/6	83.33% [35.88% - 99.58%]	7/9	77.78% [39.99% - 97.19%]	0.852

При этом для 23 возникших НЯ (95.8%) связь с исследуемым препаратом была оценена как «сомнительная»; для 1 НЯ (4.2%) связь с исследуемым препаратом, была оценена как «условная» (Таблица 15).

Такое же соотношение наблюдалось при оценке связи НЯ с проводимой процедурой РПАС: для 23 (95.8%) возникших НЯ связь с процедурой была расценена как «сомнительная», для 1 НЯ (4.2%) связь с процедурой была расценена как «условная» (Таблица 16).

Таблица 15 – Количество НЯ с группировкой по принимаемому препарату, SOC, РТ и связи с ИП

Группа ->			0.45 мг/кг		0.9 мг/кг		1.8 мг/кг		p
SOC	РТ	Связь с ИП	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы	Тромбоцитопения	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	Боль в конечности	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Нарушения со стороны нервной системы	Геморрагический инфаркт головного мозга	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Общие нарушения и реакции в месте введения	Астения	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
	Гипертермия	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	1/6	16.67% [0.42% - 64.12%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Травмы, интоксикации и осложнения процедур	Воспаление раны	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
	Процедурная боль	Сомнительная	5/9	55.56% [21.2% - 86.3%]	5/6	83.33% [35.88% - 99.58%]	7/9	77.78% [39.99% - 97.19%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	

Таблица 16 – Количество НЯ с группировкой по принимаемому препарату, SOC, РТ и связи с процедурой

Группа ->			0.45 мг/кг		0.9 мг/кг		1.8 мг/кг		p
SOC	РТ	Связь с процедурой	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	n/N	% [95% ДИ]	
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы	Тромбоцитопения	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	Боль в конечности	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Нарушения со стороны нервной системы	Геморрагический инфаркт головного мозга	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Общие нарушения и реакции в месте введения	Астения	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
	Гипертермия	Сомнительная	0/9	0% [0% - 33.63%]	1/6	16.67% [0.42% - 64.12%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
Травмы, интоксикации и осложнения процедура	Воспаление раны	Сомнительная	1/9	11.11% [0.28% - 48.25%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	1
		Условная	0/9	0% [0% - 33.63%]	0/6	0% [0% - 45.93%]	0/9	0% [0% - 33.63%]	
	Процедурная боль	Сомнительная	5/9	55.56% [21.2% - 86.3%]	5/6	83.33% [35.88% - 99.58%]	7/9	77.78% [39.99% - 97.19%]	1

Среди всех зарегистрированных нежелательных явлений 23 НЯ (95.8%) были легкой степени тяжести, 1 НЯ (4.2%) было тяжёлым по степени тяжести. В 3 когорте было зарегистрировано 1 серьезное нежелательное явление.

Таким образом, частота регистрации СНЯ составила 4.2% (1/24) среди всех НЯ для всех включенных пациентов в 3-х когортах и 11.11% среди всех НЯ,

зарегистрированных в 3-й когорте (1/9). Связь СНЯ с применением исследуемого препарата и с проводимой процедурой РПАС была расценена как «сомнительная».

Из 24 зарегистрированных НЯ в 23 случаях (95.83%) наблюдалось полное разрешение явления - субъект выздоровел, в 1 случае (4.17%) НЯ привело к смерти пациента - наступил летальный исход. Единственное СНЯ, произошедшее на I этапе исследования (фаза Ia), зарегистрированное в 3-й когорте (1,8 мг/кг) и вызванное геморрагическим инфарктом головного мозга, которое привело к летальному исходу, также, по мнению Главного исследователя и Медицинского монитора, однозначно не было связано с применением исследуемого препарата. Связь этого события с введением препарата квалифицирована как «сомнительная».

Результаты лабораторных и инструментальных исследований

По динамике результатов лабораторных и инструментальных исследований с момента Скрининга до Визита 3 на 28 ± 1 день не было отмечено каких-либо статистически значимых различий для всех измеряемых параметров во всех 3-х когортах пациентов.

Результаты оценки жизненно важных показателей

По динамике оценки жизненно важных показателей с момента Скрининга до Визита 3 не отмечено каких-либо статистически значимых различий для всех измеряемых параметров во всех 3-х когортах пациентов.

В ходе проведенного I этапа данного исследования (фаза Ia), которое являлось первым клиническим исследованием препарата на человеке, были успешно выполнены задачи, связанные с оценкой безопасности и переносимости исследуемого препарата.

Отсутствие каких-либо явлений дозолимитирующей токсичности, в том числе и в когорте пациентов, получавших максимальную расчётную дозу Инг-Рас — 1,8 мг/кг — не позволило установить максимально переносимую дозу исследуемого препарата в соответствии с дизайном исследования.

Таким образом, была подтверждена хорошая переносимость исследуемого препарата пациентами всех трех когорт исследования.

Анализ зарегистрированных в ходе исследования нежелательных явлений показал, что ни одно из них не имело достоверной связи с исследуемым препаратом (связь была оценена как «сомнительная» или «условная» по классификации ВОЗ). Эти данные, а также данные об отсутствии какого-либо негативного влияния исследуемого препарата на показатели лабораторных, инструментальных, жизненно-важных показателей в динамике с момента скрининга до момента окончания исследования позволяют сделать вывод о безопасности применения исследуемого препарата во всех изучаемых дозировках, включая максимальную рассчитанную дозировку – 1,8 мг/кг.

Результаты выполненного I этапа (фаза Ia) позволяют рекомендовать дозу 1,8 мг/кг к дальнейшему изучению для оценки первичной эффективности исследуемого препарата и к переходу на следующий этап клинического исследования.

5.2.2 Результаты исследования безопасности в ходе II этапа исследования

Результаты оценки нежелательных явлений

В ходе выполнения II этапа исследования было зарегистрировано 276 НЯ у всех 35 пациентов в популяции безопасности.

Для всех 276 НЯ, зарегистрированных в исследовании, связь с исследуемым препаратом и с процедурой РПАС была оценена по мнению исследователей как «сомнительная». Таким образом, ни одно из возникших в ходе II этапа нежелательных явлений не имело достоверной связи с назначением исследуемого препарата или проведением процедуры РПАС.

В 199 случаях из 276 (72.1%) при возникновении НЯ никаких действий по отношению к ИП не предпринималось; в 77 случаях (27.9%) при возникновении НЯ была назначена сопутствующая терапия.

Среди всех 276 зарегистрированных нежелательных явлений 265 НЯ (96.01%) были легкой степени тяжести и 11 НЯ (3.99%) умеренной степени тяжести.

В ходе выполнения II этапа исследования было зарегистрировано 3 СНЯ. Таким образом, частота регистрации СНЯ составила 1.09% (3/276) среди всех НЯ. Связь СНЯ с применением исследуемого препарата и с проводимой процедурой РИРАС была расценена как «сомнительная».

Все 276 НЯ (100%) были оценены исследователями, как непредвиденные.

В 220 случаях (79.71%) нежелательные явления разрешились и закончилось выздоровлением пациента, в 1 случае (0.36%) – нежелательные явления разрешились с осложнением, в 48 случаях (17.39%) нежелательные явления не разрешились; состояние ухудшилось у 3 пациентов (1.09%), в 4 случаях нежелательных явлений исход неизвестен (1.45%). Было зарегистрировано 3 СНЯ.

Таким образом, частота регистрации СНЯ составила 1.09% (3/276) среди всех НЯ. Связь СНЯ с применением исследуемого препарата и с проводимой процедурой РИРАС была расценена исследователями как «сомнительная».

Результаты оценки лабораторных и инструментальных исследований

В ходе исследования выявлены статистически достоверные различия в биохимическом анализе крови по следующим показателям:

- альбумин — на визите 1 (введение препарата 1), визите 1 (дни наблюдения 2, 9, 11), визитах 3, 5, 7, 8;
- глюкоза — на визите 1 (введение препарата 1), визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 7, 9, 11, 14);
- креатинин — на визитах 5, 6, 7, 8;
- мочевины — на визите 1 (день наблюдения 14);
- общий белок — на визите 1 (введение препарата 1), визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 9, 11, 14);
- общий билирубин — на визите 1 (дни наблюдения 7, 8, 11, 14), визитах 2, 4, 8.

Были выявлены клинически значимые отклонения от референсных значений показателей биохимического анализа крови – АЛТ, АСТ, альбумина, креатинина, мочевины, общего белка, общего билирубина, щелочной фосфатазы. Статистически значимые отклонения от референсных значений по показателю общий белок были зарегистрированы на Визите 1 введение препарата, Визите 1 день наблюдения 2, 4, 7, 11 и на Визите 4 (60 ± 7 дней).

Также выявлены статистически достоверные различия в клиническом анализе крови по следующим показателям:

- сегментоядерные нейтрофилы и лимфоциты — на визите 1 (дни наблюдения 2, 9);
- эозинофилы — на визите 1 (дни наблюдения 2, 14);
- моноциты и лейкоциты — на визите 1 (день наблюдения 2);
- гематокрит — на визите 1 (дни наблюдения 2, 9, 11, 14) и визите 5.

Были выявлены клинически значимые отклонения от референсных значений показателей клинического анализа крови – палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, гематокрита, СОЭ, количества лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов.

Клинически значимые отклонения от референсных значений зарегистрированы по следующим показателям клинического анализа крови:

- палочкоядерные нейтрофилы — на визите 1 (день наблюдения 2);
- сегментоядерные нейтрофилы — на визите 1 (день наблюдения 4);
- гематокрит — на визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 7, 9, 11, 14) и визитах 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8;
- количество лейкоцитов — на визите 1 (день наблюдения 2);
- СОЭ — на визите 1 (день наблюдения 14);
- количество эритроцитов — на визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 7, 9, 11, 14) и визитах 2, 3, 5, 6, 7.

В ходе исследования были выявлены статистически достоверные различия в общем анализе мочи по следующим показателям:

- значения рН — на визите 1 (дни наблюдения 4, 7, 9, 14) и визитах 2, 3, 7, 8;
- относительная плотность — на визите 1 (дни наблюдения 4, 7, 11, 14) и визитах 2, 3, 4, 5, 6, 7;
- содержание кетонов — на визите 1 (день наблюдения 2);
- лейкоциты — на визите 8;
- уробилиноген — на визитах 6, 7, 8;
- переходный и плоский эпителий — на визите 8.

Были выявлены клинически значимые отклонения от референсных значений показателей общего анализа мочи – белок, глюкоза, кетоны, лейкоциты, уробилиноген, плоский эпителий, эритроциты.

Однако не наблюдалось статистически достоверных различий в количественных показателях коагулограммы, за исключением показателей D-димера на Визите 1 дни наблюдения 2 и 9 и протромбинового времени на Визите 1 день наблюдения 9. Были выявлены клинически значимые отклонения от референсных значений показателей коагулограммы – D-димера, АЧТВ, протромбина, фибриногена.

Статистически значимые отклонения от референсных значений зарегистрированы по следующим показателям коагулограммы:

- D-димер — на визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 7, 9, 11, 14) и визитах 2, 3;
- АЧТВ — на визите 1 (дни наблюдения 4, 7, 9, 11, 14) и визитах 2, 3;
- фибриноген — на визите 1 (дни наблюдения 2, 4, 7, 9, 11, 14) и визитах 2, 3.

Кроме того, не было отмечено статистически достоверных различий между количественными показателями ЭКГ, зарегистрированными на визите Скрининга и на Визитах исследования. Статистические значимых различий показателей электрокардиографии по отношению к референсным значениям на протяжении II этапа исследования зарегистрировано не было, за исключением данных интерпретации ЭКГ на Визите 1 на 9 день наблюдения. Были выявлены

клинически значимые отклонения от референсных значений интерпретации результатов ЭКГ, показателей PQ, QRS, QT, RR и ЧСС.

Результаты оценки жизненно важных показателей и физикального осмотра

Для измеряемых жизненно-важных показателей не было отмечено статистически достоверных различий между значениями, зарегистрированными на визите Скрининга и на Визитах исследования, за исключением показателей систолического артериального давления на Визитах 5 и 6 и частоты дыхательных движений на Визите 1 дни наблюдения 12, 13.

Статистически значимые отклонения жизненно важных показателей от референсных значений зарегистрированы по следующим параметрам:

- диастолическое давление — на визите 5;
- систолическое давление — на визитах 4, 5, 7, 8;
- частота сердечных сокращений — на визитах 3, 4.

Все выявленные отклонения жизненно-важных показателей на протяжении II этапа исследования были клинически не значимы, за исключением температуры тела на Визите 1, введение препарата 2.

Не было отмечено статистически достоверных различий между показателями физикального осмотра, зарегистрированными на визите Скрининга и на Визитах исследования. Клинически значимые отклонения зарегистрированы по следующим показателям:

- состояние дыхательной системы — на визитах 6, 7, 8;
- состояние ЖКТ — на визите 2;
- костно-мышечная система — на визитах 4, 5, 6, 7;
- мочеполовая система — на визите 1 (14-й день наблюдения) и визитах 2, 3;
- сердечно-сосудистая система — на визите 1 (9-й день наблюдения).

5.2.3 Дозолимитирующая токсичность

За время проведения I этапа исследования ни в одной из 3х когорт ни у одного из пациентов не были зарегистрированы какие-либо признаки дозолимитирующей токсичности. Детали представлены в таблице 17. Полученные в ходе I этапа (фаза Ia) данные позволяют утверждать, что исследуемый препарат Инг-Рас в дозировках, выбранных для изучения в настоящем исследовании, продемонстрировал хорошую переносимость пациентами.

Таблица 17 – Частота встречаемости признаков дозолимитирующей токсичности в каждой когорте

Признак	I когорта 0.45 мг/к (N пациентов = 4)	II когорта 0.9 мг/кг (N пациентов =3)	III когорта 1.8 мг/кг (N пациентов =4)
	% [ДИ]	% [ДИ]	% [ДИ]
Негематологическая токсичность степени 3 или выше в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института онкологии США (СТСАЕ), версия 5.0	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
Нейтропения 4 степени продолжительностью >5 дней	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
Фебрильная нейтропения любой степени или продолжительности в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института онкологии США (СТСАЕ), версия 5.0	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
Тромбоцитопения 4 степени или тромбоцитопения 3 степени, ассоциированная с кровотечением	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
АЛТ в 3 и более раз выше верхней границы нормальных значений и общий билирубин в 3 и более раз выше верхней границы нормальных значений	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
Любая токсичность степени 2 и выше по СТСАЕ, версия 5.0, которая, по мнению Исследователя и Спонсора может быть определена как дозолимитирующая.	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]
Снижение фракции выброса левого желудочка 3 степени и выше.	0% [0% - 60.24%]	0% [0% - 70.76%]	0% [0% - 60.24%]

Отсутствие признаков дозолимитирующей токсичности на протяжении всего исследования у всех пациентов, получавших препарат по Протоколу (в том числе в когорте 1,8 мг/кг), послужило основанием для выбора этой дозы как рекомендуемой для II этапа исследования с целью оценки первичной эффективности препарата Инг-Рас

5.3 Результаты оценки эффективности препарата «Инг-Рас» при проведении I/IIa фазы клинических исследований в сравнении с контрольной (ретроспективной) группой

В рамках следующего этапа исследования была проведена - оценка эффективности препарата Инг-Рас (пептидный ингибитор Ras-ГТФазы) в ходе проведения клинических исследований I-IIa фазы (разрешение МЗ №177 от 30 марта 2023 г, Протокол №2022-1-Инг-Рас). Программа клинических исследований предусматривала однократное и многократное интраперитонеальное введение. Конечная доза составила - 1,8 мг/кг двукратно с интервалом 7 дней. Группа пациентов составила пациентов с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта (колоректальный рак, рак желудка), включая пациентов с перитонеальным канцероматозом.

Для получения данных, по предварительной оценке, эффективности препарата «Инг-Рас» была проведена сравнительная оценка - препарата по данным общей и безрецидивной выживаемости пациентов на этапах I и IIa (по данным на 360-й день этапа) и пациентов из группы исторического контроля (ретроспективный анализ). Использование исторического контроля (а также данных, опубликованных в открытой научной литературе), как группы сравнения обусловлено отсутствием группы плацебо при исследованиях I-IIa фазы.

Определение показателей общей и безрецидивной выживаемости пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак для группы исторического контроля было проведено по данным открытых информационных источников. Согласно статистическим данным, в 2023 году на территории РФ впервые зарегистрировано 633199 новых случаев злокачественных новообразований (без

учета посмертных). Среди них с диагнозами: рак желудка (С16) - 30502 пациентов (4,87%); рак ободочной кишки (С18) - 43566 пациентов (6,79%); рак прямой кишки, ректосигмоидного соединения и ануса (С19-21) - 31322 пациентов (5,00%) [8, 9]. Распределение пациентов по стадиям заболевания и летальность в данных группах отражены в таблице 18. Летальность в течение 12 месяцев от даты постановки диагноза для пациентов с диагнозом «колоректальный рак» составляет 19,6%. Данных о безрецидивной выживаемости в официальных сведениях по РФ не представлено, поэтому мы обратились к открытым источникам.

Таблица 18 – Статистические данные заболеваемости и летальности пациентов за 2023 г. по Российской Федерации

Локализация опухоли	Код МКБ 10	впервые зарегистрировано		стадия заболевания, %		Летальность, %*	Общая выживаемость, 12 месяцев, %
		абс. число	%	III	IV		
Желудок	С16	30502	4,82	18,8	35,6	40,0	60,0
Ободочная кишка	С18	43566	6,88	23,0	25,4	20,6	79,4
Прямая кишка, ректосигм. соед, анус	С19-21	31322	4,95	31,2	21,0	18,2	81,8

*Летальность больных в течение года с момента установления диагноза злокачественного новообразования (из числа больных, впервые взятых на учет в предыдущем году)

По результатам оценки показателей общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) пациентов с диагнозом рак желудка сведения представлены в таблице 19.

Для колоректального рака данные по международным исследованиям, включающим сведения об общей выживаемости и процентах случаев наступления рецидива, без учета стадии заболевания представлены в таблице 20.

В среднем, частота рецидивов в течение 36 месяцев наблюдается в 20,5% случаев, а общая пятилетняя выживаемость составляет 70%. Полученные данные близки к официальной статистке, согласно которой по данным National Cancer Institute U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health,

общая 5-летняя выживаемость при КРР составляет 65,0% [160], 64,4% при локализованных формах – 91,1%, при наличии регионарных метастазов – 73,7%, при наличии отдаленных метастазов – 15,7% [159].

Таблица 19 – Результаты клинических исследований (КИ) с участием пациентов с диагнозом рак желудка

Название КИ	n	Терапия	ОВ, месяц	БРВ, месяц	Ссылка на публикацию
TOGA (HER2)	594	CP–FP + trastuzumab;	13,8	6,7	Bang, Y.-J. et al. 2010. [59]
		CP–FP	11,1	5,5	
COG (EGFR)	450	Gefitinib	3,73	1,57	Dutton, S. J. et al. 2014 [118]
		placebo	3,67	1,17	
RAINFALL (VEGF)	645	CP+ ramucirumab;	11,2	5,6	Fuchs, C. S. et al. 2019 [127]
		CP	10,7	6,0	
RILOMET (MET)	609	EPC+rilotumumab	8,8	5,6	Catenacci, D. V. T. et al. 2017 [82]
		EPC	10,7	6,0	
KEYNOTE-590 (PDL1 CPS \geq 10) (Immunotherapy)	763	Pembrolizumab + chemotherapy	10,6	2,1	Sun, J. M. et al. 2021 [344]
		chemotherapy	11,1	6,4	
SHINE (FGFR2)	71	AZD4547;	5,5	1,8	Van Cutsem, E. et al. 2017 [362]
		paclitaxel	6,6	3,5	
Средние значения			8,96	4,33	

Таблица 20 – Результаты клинических исследований, сведения о сроках наступления рецидивов и общей выживаемости пациентов с диагнозом колоректальный рак без учета стадии заболевания

Исследование	Терапия	Рецидив, 2 года, %	Рецидив, 3 года, %	ОВ, 5 лет, %	Ссылка
(FOxTROT) НАХТ и без нее (контроль)	НАХТ	16,9		72,68	Morton D. et al. 2023 [258]
	контроль	21,5		66,9	
mFOLFIRINOX	+НАХТ+ Хирургия+АХТ 230 пац.		31,5		Borg C, et al. 2020 [71]
	Хирургия+АХТ 231 пац.		24,5		
ретроспективное когортное многоцентровое исследование	НАХТ+Хирургия		13,6		Лукмонов С.Н. и соавт. 2024 [17]
	Хирургия		12,6		

По литературным данным при распространенных формах (III и IV стадии) колоректального рака медианы общей и безрецидивной выживаемости резко снижаются (Таблица 21). И в среднем медиана безрецидивной выживаемости составляет 7,78 месяца, медиана общей выживаемости - 26,15 месяца.

Таблица 21 –Результаты клинических исследований, сведения о безрецидивной и общей выживаемости пациентов с диагнозом колоректальный рак III и IV стадии

Исследование/к оличество пациентов	Терапия	ОВ меди ана, меся ц	Медиана ВБП выжив. без прогресси рования, месяц	Ссылка на публикацию
JCOG1007 (iPACS) KPP IV стадия/165 пациентов	Хирургич еское+ ХТ	25,9	10,4	https://www.rosoncweb.ru/news/oncology/2020/10/12-3/ (ESMO 2020. Колоректальный рак)
	ХТ	26,4	1,12	
Влияние мутации RAS/ 119 пациентов	RAS- позитивн ые		9,5	Huiyan L, et al. 2020 [164]
	RAS- негативн ые		10,1	

Таким образом, из открытых литературных источников было определено, что для пациентов с диагнозом рак желудка медиана общей выживаемости составляет - 8,96 месяца, медиана безрецидивной выживаемости - 4,33 месяца. Для пациентов с распространенными формами колоректального рака медиана общей выживаемости составляет – 26,15 месяца, медиана безрецидивной выживаемости – 7,78 месяца.

Для оценки показателей ОВ и БРВ также была использована база результатов прослеживаемости пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак ФГБУ РНЦРР [5, 30].

Всего база содержит данные 449 пациентов с диагнозом рак желудка, медиана наблюдения для данных пациентов составляет 27,7 месяцев,

прогрессирование на данный момент зафиксировано в 42,24% случаев и средний срок наступления рецидива составляет 18,7 месяцев от даты оперативного вмешательства. Пациентов, включенных в базу, с диагнозом колоректальный рак – 974 человека, медиана наблюдения составляет 41,15 месяцев, рецидив зафиксирован в 29,72% случаев с медианой наступления рецидива – 20,04 месяца.

В целях сопоставления пациентов, включенных в клиническое исследование «Инг-Рас» и пациентов базы ФГБУ «РНЦРР», была проведена процедура цензурирования базы и подобраны пациенты, наиболее близко по критериям пола, возраста, стадии заболевания и срокам наблюдения, соответствующие пациентам клинического исследования «Инг-Рас». Личные данные пациентов контрольной группы были полностью заслеплены для участников исследовательской группы, проводивших её создание и анализ данных.

Предварительная общая и безрецидивная выживаемость определялись от даты проведения хирургического вмешательства (даты включения пациента в исследование, или даты начала наблюдения за пациентом, в случае контрольной группы) до даты смерти пациента или даты задокументированного факта прогрессирования заболевания (в соответствии с критериями RECIST 1.1). На рисунке 79 представлены данные по кумулятивной доле безрецидивной выживаемости (%) по методу Каплана–Мейера (время наступления рецидива указано в месяцах) в сравнении с данными пациентов из группы исторического контроля и группы пациентов, получавших препарат «Инг-Рас» вне зависимости от диагноза.

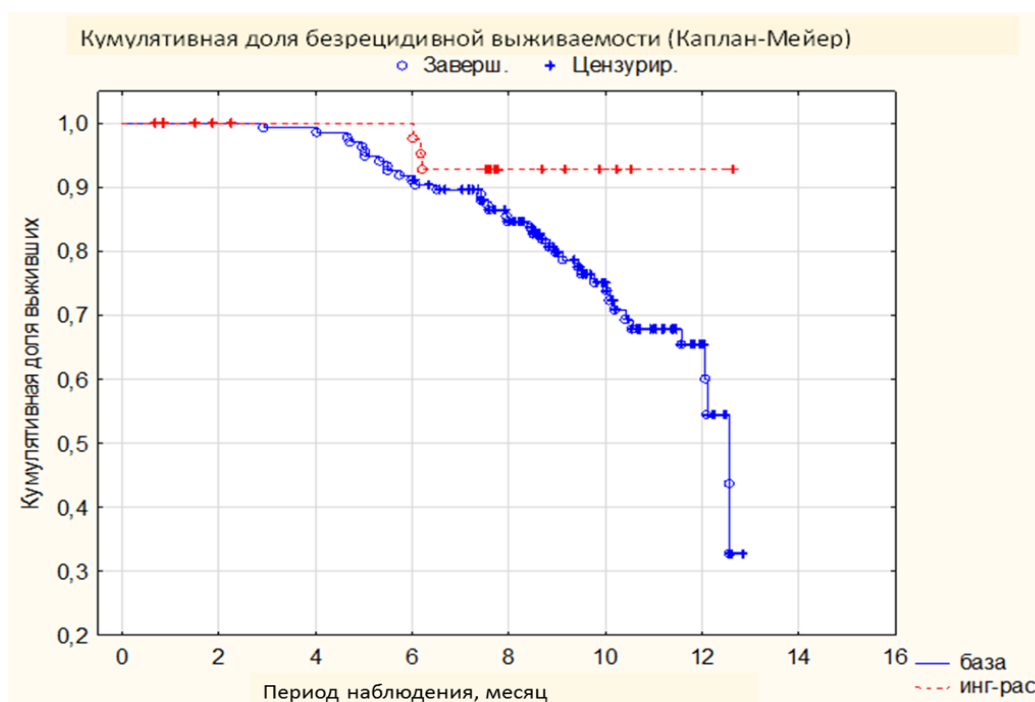


Рисунок 79 – Функции безрецидивной выживаемости, посчитанные по методу Каплана Мейера, для пациентов объединенных баз «рак желудка-колоректальный рак», сравнение группы «Инг-Рас» и контрольной цензурированной группы

Согласно полученной функции, рассчитанное время наступления рецидива (Т), для контрольной группы составляет – 6,96 месяца, для группы с применением препарата «Инг-Рас» – 25,04 месяца ($F(6, 56) = 2,594880$; $p = 0,02735$). Т.о. включение препарата «Инг-Рас» в схему лечения пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта, позволяет в 3,6 раза увеличить срок безрецидивной выживаемости.

Для пациентов группы Инг-Рас с диагнозом колоректальный рак, медиана наблюдения после проведенного хирургического вмешательства по поводу основного заболевания, на момент 180 день клинического исследования, составила 17,71 месяца, рецидив зафиксирован у 23,8% пациентов, медиана наступления рецидива составила 17,85 месяцев. Пациенты цензурированной группы контроля имели медиану наблюдения 19,35 месяцев, рецидив был диагностирован у 40,0% пациентов, медиана наступления рецидива составила 14,37 месяцев. На Рисунке 80 представлен график функции безрецидивной

выживаемости пациентов с диагнозом колоректальный рак группы «Инг-Рас» и группы контроля.

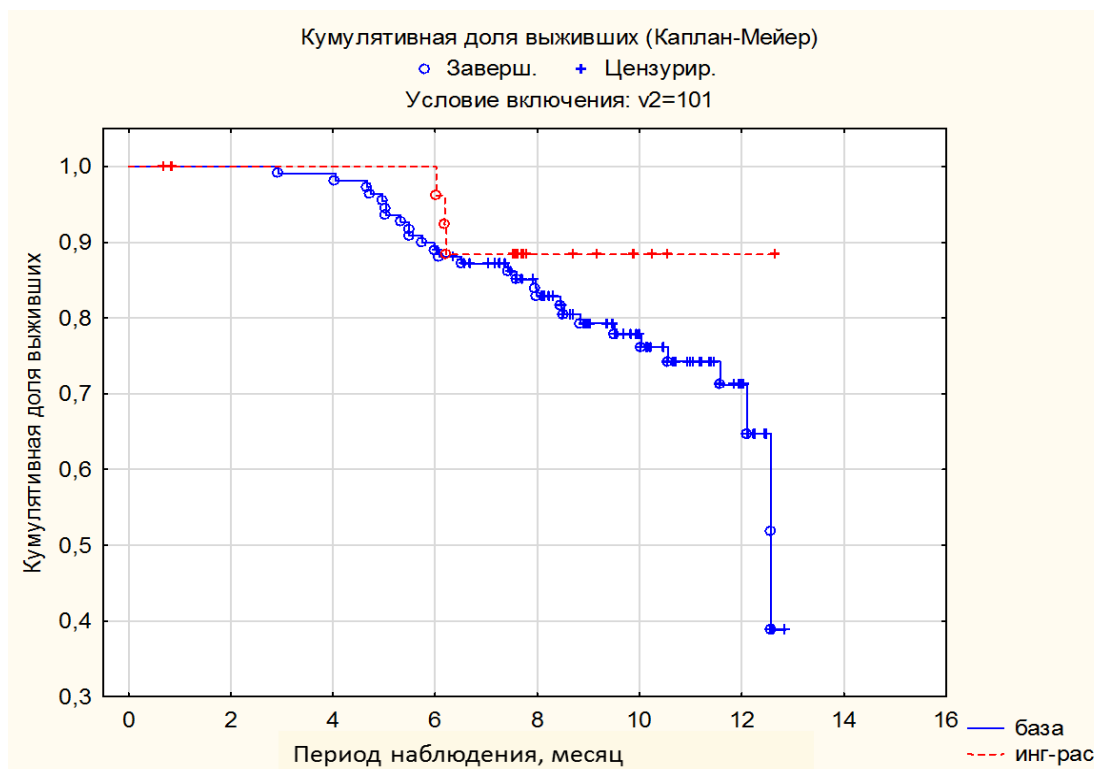


Рисунок 80 – Функции безрецидивной выживаемости, посчитанные по методу Каплана-Мейера, для пациентов с диагнозом «колоректальный рак», сравнение группы «Инг-Рас» и контрольной цензированной группы

Таким образом, срок наступления рецидива при применении препарата Инг-Рас снижен на 19,5% по сравнению с группой контроля ФГБУ «РНЦРР» и на 56,4% с данными по БРВ для пациентов с диагнозом колоректальный рак III-IV стадий по данным открытых литературных источников.

Среди пациентов с диагнозом «рак желудка» группы «Инг-Рас», на момент 180 дня наблюдения, не было зафиксировано случаев наступления рецидива, в связи с чем, не может быть оценен параметр «срок наступления рецидива». В группе контроля с диагнозом «рак желудка» процент случаев наступления рецидива в срок 6 месяцев от даты операции составил 11,59%, тем самым применение исследуемого препарата «Инг-Рас» позволяет увеличить срок безрецидивной выживаемости данных пациентов и снизить риск возникновения рецидива при раке желудка.

После достижения срока наблюдения 360 дней в группе при проведении клинического исследования I-IIa фазы с введением препарата «Инг-Рас» были пересчитаны сроки безрецидивной выживаемости от даты хирургического лечения и произведено сравнение с контрольной группой, описанной выше. Анализ безрецидивной выживаемости, проведенный с помощью метода Каплана-Мейера и позволяющий оценить вероятность наступления события (рецидива), при заданном сроке наблюдения в 12 лет, приведен на рисунках 81, 82.

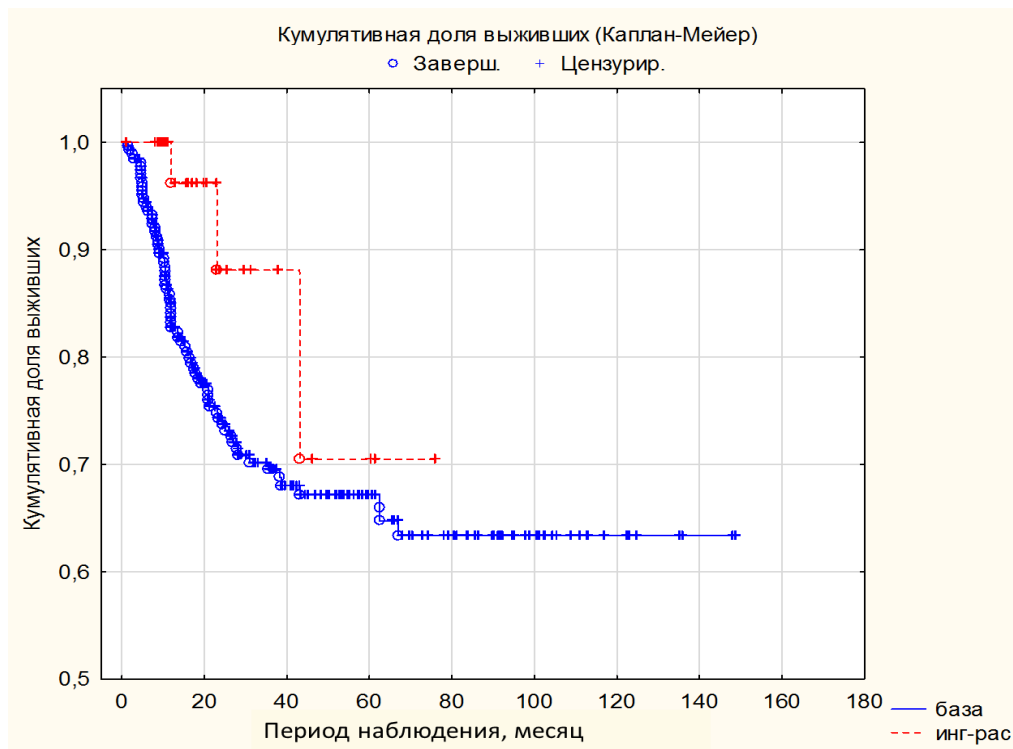


Рисунок 81 –Сравнение безрецидивной выживаемости в группах «Инг-Рас» и контрольной группе – пациенты объединенной базы ФГБУ РНЦРР «рак желудка-колоректальный рак» при сроке наблюдения 12 лет

Было показано, что включение препарата «Инг-Рас» в схему лечения позволяет увеличить показатель безрецидивной выживаемости. Достоверность отличия была доказана с помощью нескольких статистических методов/критериев:

Ф-Критерий Кокса: $T1 = 65,99039$; $T2 = 12,00962$; $F(6, 148) = 4,489096$; $p = 0,00033$;

Критерий Гехана-Вилкоксона: $WW = -1519$; $\text{Сум} = 3881E3$; $\text{Дис} = 4602E2$;
 Стат. крит. = $-2,23850$; $p = 0,02519$;

Критерий Кокса-Ментела: $I = 7,348708$; $U = -5,37040$; Стат. крит. = $-1,98108$;
 $p = 0,04758$.

Для группы пациентов «Инг-Рас» наиболее резкий скачок в снижении показателя безрецидивной выживаемости наблюдается в интервал 3,0-3,5 года (примерно 42 месяца).

При сокращении срока наблюдения в контрольной группе объединенной базы ФГБУ РНЦРР «рак желудка-колоректальный рак» до 3 лет, анализ кривых безрецидивной выживаемости позволяет прогнозировать, что при использовании препарата «Инг-Рас» в схеме лечения около 81% пациентов не будут иметь признаки прогрессирования, в то время, как в группе контроля данный показатель составляет 45% (Рисунок 82).

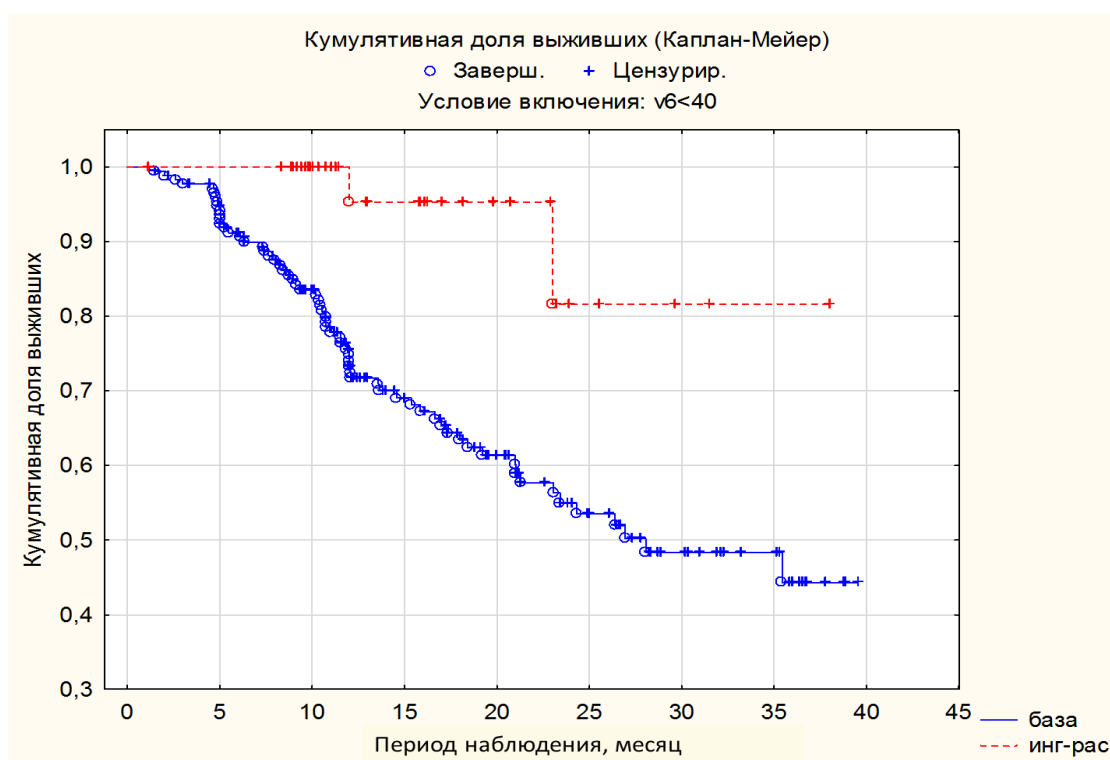


Рисунок 82 – Сравнение безрецидивной выживаемости в группах «Инг-Рас» и контрольная группа – пациенты объединенной базы ФГБУ «РНЦРР» «рак желудка-колоректальный рак» при сроке наблюдения 3 года

При этом достоверность отличия подтверждается основными статистическими критериями:

Критерий Гехана-Вилкоксона: $WW = -1527$; Сум=1771E3; Дис = 2511E2; Стат. крит. = -3,04602; **p=0,00232**.

F-Критерий Кокса: $T1 = 52,91687$; $T2 = 14,08313$; $F(4, 128) = 8,516377$; **p=0,00000**.

Критерий Гехана-Вилкоксона: $WW = -1420$; Сум = 1345E3; Дис = 1981E2; Стат. крит. = -3,18931; **p=0,00143**.

Таким образом, при сроке наблюдения 12 месяцев определяется тенденция увеличения сроков безрецидивной выживаемости (достоверность подтверждается рядом статистических критериев) в экспериментальной группе «Инг-Рас» по сравнению с историческим контролем. При этом, анализ публикаций показывает сравнимость сроков безрецидивной выживаемости контрольной группы ФГБУ «РНЦРР» с данными других исследований.

Проведенное первое клиническое исследование препарата Инг-Рас (пептидный ингибитор Ras-ГТФазы) подтвердило хорошую переносимость исследуемого препарата в дозе 1,8 мг/кг.

Уровень общей выживаемости в течение 1 года для пациентов, включенных в исследование, составил 97,5%, что на 46,7% выше, чем в группе исторического контроля по данным открытых литературных источников. Выживаемость без прогрессирования в течение 1 года (83,34 %) для пациентов, включенных в исследование, на 29,07% выше, чем в группе контроля (54,27%). Медианная выживаемость без прогрессирования составила 4.45 лет.

Сравнение полученных результатов с литературными данными показали перспективность дальнейших исследований препарата Инг-Рас, потенциальное его превосходство над аналогичными препаратами и схемами лечения распространенных стадий колоректального рака и рака желудка [71, 121, 160, 300, 315].

Препарат Инг-Рас представляет собой перспективное терапевтическое средство, разработанное специально для лечения злокачественных

новообразований, включая опухоли желудочно-кишечного тракта, осложненные перитонеальным канцероматозом. На сегодняшний день такие состояния остаются сложной задачей для современной онкологической практики ввиду низкой эффективности традиционных методов химиотерапии и ограниченной продолжительности жизни пациентов даже при адекватном лечении.

Результаты проведенных клинических исследований I/IIa фазы показали, что применение Инг-Рас характеризуется минимальным количеством серьезных нежелательных реакций, связанных непосредственно с лечением. Профиль безопасности препарата отличается от большинства существующих препаратов для химиотерапии, известных своими выраженными токсическими эффектами. Отсутствие тяжелых осложнений делает Инг-Рас особенно привлекательным вариантом для пациентов с ослабленным состоянием здоровья, перенесшими ранее агрессивные методы лечения.

Исследование показывает значительное повышение общего уровня выживаемости и увеличение сроков выживания без прогрессирования болезни. Перитонеальное метастазирование представляет серьезную проблему из-за быстрого распространения опухолевых клеток и неэффективности стандартных подходов. Однако полученные данные показывают, что Инг-Рас способен эффективно контролировать распространение опухоли и улучшать общий прогноз даже в сложных случаях. Благодаря низкому уровню токсичности и хорошим характеристикам переносимости, Инг-Рас имеет потенциал для включения в комплексные схемы лечения совместно с хирургическими методами, лучевой терапией и другими препаратами. Такое комбинирование позволит оптимизировать лечебный процесс и повысить шансы на успех лечения каждого конкретного пациента.

Несмотря на очевидные преимущества, полученные результаты требуют дополнительного подтверждения путем проведения крупных многоцентровых рандомизированных контролируемых испытаний, включающих большую группу пациентов различных нозологий. Такие исследования позволят определить

оптимальный режим дозирования, показания к применению и возможные ограничения.

Тем не менее, уже имеющиеся данные позволяют рассматривать Инг-Рас как потенциально эффективное дополнение к существующей фармакотерапии злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Учитывая уникальную комбинацию высокой эффективности и низкого риска развития побочных эффектов, Инг-Рас открывает новые перспективы для персонализированного подхода к лечению онкологических больных, способствуя улучшению их жизненного прогноза и повышению качества жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таргетная терапия представляет собой относительно новое направление в лечении онкологических заболеваний, ставшее неотъемлемой частью современного подхода к борьбе с большинством злокачественных новообразований. В отличие от традиционной цитотоксической химиотерапии, отличающейся низкой специфичностью и широким спектром неблагоприятных последствий, принцип действия таргетных препаратов основан на точечном воздействии на молекулярные мишени, определяющие патологическое поведение опухолевых клеток.

История развития таргетных препаратов началась в конце XX века и связана с разработкой моноклональных антител, направленных на поверхностные опухолевые антигены. В частности, в 1997 году был зарегистрирован Ритуксимаб (Мабтера), нацеленный на антиген CD20 и используемый при лечении В-клеточных лимфом, а в следующем году появился Трастузумаб (Герцептин), предназначенный для терапии HER2-позитивного рака молочной железы [285]. Третья веха развития наступила в 2001 году, когда FDA одобрила Иматиниб - первый препарат, действующий на внутриклеточную мишень, тирозинкиназу BCR-ABL. Сегодня известно около 40 различных классов таргетных препаратов, включая ингибиторы сигнальных путей, стимулирующие апоптоз, ингибиторы ангиогенеза и репарации ДНК, каждый из которых обладает высокой степенью специфичности и оказывает минимальное воздействие на здоровые ткани организма.

Активные исследования сигнальных путей и механизмов регуляции клеточного цикла открыли возможности для выявления новых мишеней, необходимых для разработки следующего поколения таргетных препаратов. Особое внимание уделяется изучению роли белков семейства Ras, частота выявления мутантных форм которых достигает 25% при всех злокачественных новообразованиях [126, 293]. Долгое время Ras-белки считались недоступными мишенями для фармакологического вмешательства. Изменить ситуацию позволила разработка ингибиторов KRAS G12C, таких как Соторасиб и

Адаграсиб. Оба препарата показали значимое преимущество перед стандартной химиотерапией, существенно увеличив показатели безрецидивной выживаемости пациентов с раком легкого [106, 156, 175].

Большой интерес и важность в разработке таргетных лекарственных препаратов играют циклин-зависимые киназы, в частности CDK4/6, участвующие в регуляции клеточного цикла. Селективные ингибиторы CDK4/6, такие как Палбоциклиб, Абемациклиб и Рибоциклиб, уже зарекомендовали себя как эффективные противоопухолевые препараты, позволяющие существенно увеличивать продолжительность жизни пациентов [354, 292, 45]. Тем не менее, устойчивая проблема приобретения резистентности к ним продолжает оставаться предметом глубоких научных изысканий.

Актуальной проблемой при разработке таргетных препаратов, направленных на внутриклеточные мишени, остается сложность в преодолении барьера клеточных мембран. Одной из возможностей решения данной проблемы является использование интернализуемых пептидов (Cell Penetrating Peptides, CPPs), способных эффективно проникать внутрь клеток и осуществлять внутриклеточную доставку биологически активных молекул без повреждения плазматической мембраны [72, 84, 387]. Этот подход имеет ключевое значение для современной персонализированной медицины, обеспечивая переход от широкого спектра воздействий традиционной цитотоксической химиотерапии к целенаправленному и точечному воздействию на конкретные молекулярные мишени, что повышает эффективность лечения и снижает токсичную нагрузку на здоровые ткани организма [288, 301].

Улучшение методик конструирования лекарственных средств, внедрение технологий высокопроизводительного скрининга и применение геномной диагностики способствуют полному раскрытию потенциала таргетной терапии. Совокупность приведенных научно-диагностических тенденций позволяет оказывать положительный эффект на качество и продолжительность жизни пациентов [317, 338, 364].

Создание и внедрение новых таргетных методов лечения и иммунотерапии, а также разработка и реализация персонализированных терапевтических подходов остаются важными вопросами большого числа научных работ. Исследование молекулярных основ канцерогенеза и идентификация специфических клеточных мишеней создают уникальные возможности для разработки высокоэффективных и низкотоксичных лекарственных средств, способных существенно улучшить прогноз и качество жизни пациентов, одновременно сокращая риск осложнений и негативных эффектов, ассоциированных с традиционными методами терапии. Расширение спектра таргетных препаратов является одной из ключевых задач современной медицины и фармацевтической индустрии, что и явилось посылком к выполнению данной работы.

Целью нашего исследования была разработка технологии получения новых пептидных противоопухолевых препаратов и проведение комплекса доклинических и клинических исследований пептидного ингибитора Ras-ГТФазы («Инг-Рас»).

Для реализации данной цели нами были поставлены и решены следующие задачи:

1. Провести поиск и разработку пептидов, обладающих способностью ингибировать ключевые белки канцерогенеза, ответственные за процессы контроля пролиферации, дифференцировки и выживания;

2. Исследовать в условиях *in vitro* биологические и противоопухолевые свойства пептидов, ингибирующих ключевые белковые комплексы контроля пролиферации, дифференцировки и выживания клеток. Выбрать наиболее эффективную пептидную конструкцию для последующего изучения в качестве нового потенциального лекарственного препарата;

3. Оценить эффективность и специфическую противоопухолевую активность выбранного пептида – ингибитора Ras-ГТФазы – потенциального противоопухолевого препарата с использованием методов *in vitro* и *in vivo*. Выявить наиболее эффективные способы и схемы введения препарата;

4. Провести полный комплекс доклинических исследований нового потенциального лекарственного препарата и оценить результаты проведенных исследований;

5. Разработать с учетом результатов доклинических исследований дизайн клинического исследования I/IIa фазы потенциального лекарственного препарата «Инг-Рас», полученного на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы;

6. Провести клинические исследования I/IIa фазы потенциального препарата «Инг-Рас», оценить его безопасность и первичную эффективность у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта, имеющих высокий риск развития перитонеального канцероматоза.

Разработка новых высокоактивных ингибиторов сигнального пути MAPK/ERK (RAS-RAF-MEK-ERK) представляет значительный интерес для противоопухолевой терапии ввиду ключевой роли данного пути в процессах жизнеобеспечения, распространения опухолевых клеток и формирования их устойчивости к лекарственным средствам. Ras — один из наиболее часто встречаемых онкогенов человека, на который пока не оказывает влияние ни один зарегистрированный препарат. Гиперактивация сигнального пути MAPK/ERK вследствие мутаций гена Ras встречается примерно в четверти случаев человеческих опухолей. Мутации Ras-ГТФаз приводят к постоянному пребыванию Ras-киназы в активированном состоянии в комплексе с GTP. Формирование двойного комплекса Ras-GTP способствует образованию активного тройного комплекса Ras-Raf-GTP, который запускает фосфолирование MEK-киназы, инициируя каскад последующих ферментативных реакций.

Основой выполненного диссертационного исследования стала концепция разработки новых пептидных противоопухолевых препаратов, предложенная в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В основе данной концепции лежит создание препаратов, состоящих из функционального и транспортного фрагментов, что позволяет эффективно

воздействовать на молекулярную мишень и обеспечивает необходимое внутриклеточное проникновение.

Первый этап исследования был направлен на выявление перспективных молекулярных мишеней и разработку пептидных ингибиторов, способных влиять на процессы клеточной пролиферации и апоптоза. Анализ литературных данных выявил ключевое значение белковых комплексов, участвующих в сигнальной передаче митогенного импульса и определяющих контроль над процессами деления клеток. Наиболее значимыми оказались комплексы, ассоциированные с такими молекулами, как Ras-GTP/Raf, c-Jun/c-Fos, c-Myc/Max, E2F1/DP1, циклины D/A и циклин-зависимые киназы (CDKs).

Для идентификации потенциальных ингибиторных пептидов, гомологичных связующим участкам выбранных белковых комплексов, были использованы методы белковой инженерии и компьютерного моделирования, которые позволили определить структуру аминокислотных последовательностей, обладающих наибольшим сродством к молекулярным мишеням. В результате была сформирована библиотека, включающая тринадцать пептидных молекул. Проведенные экспериментальные исследования показали различную степень антипролиферативной активности полученных пептидов на культурах опухолевых клеток человека (A549 и HT29). Наибольшее ингибирующее действие продемонстрировали ингибиторы Ras и E2F, а также функциональный фрагмент p16INK4a. Данные пептидные конструкции оказывали стойкий антипролиферативный эффект в концентрациях от 10–20 мкмоль/л на исследуемые клеточные линии.

Наиболее перспективным кандидатом для дальнейших доклинических испытаний был признан пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас»), который продемонстрировал высокий уровень противоопухолевой активности и стабильность результатов.

Комплексные доклинические исследования пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас») подтвердили его потенциал в качестве эффективного противоопухолевого агента. Исследования в условиях *in vitro* были направлены на

оценку проникающей способности и специфической фармакологической активности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас»), а также на изучение молекулярных механизмов его воздействия на активно пролиферирующие опухолевые клетки. Используя методы проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, удалось подтвердить эффективное внутриклеточное проникновение пептида в клетки, благодаря наличию встроенного интрализуемого вектора CPP (Antp). Накопление пептидного ингибитора Ras-ГТФазы детектировалось преимущественно в ядре и перенуклеарной зоне клеток.

Выявлена стойкая зависимость снижения пролиферативной активности опухолевых клеток (HT-29, A549, HCT116) от концентрации внесенного пептида. При увеличении концентрации пептидного ингибитора Ras-ГТФазы до 40 мкМ наблюдалась полная остановка клеточного деления. При этом наиболее чувствительными оказались клетки HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), в то время как OVCAR-3 и OAW-42 (рак яичников) проявили большую устойчивость к антипролиферативному воздействию.

Методом ПЦР в реальном времени был исследован и подтвержден механизм воздействия пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас») на молекулярные мишени сигнального пути Ras-Raf-МАРК. Механизм действия заключается в ингибировании ферментативного комплекса, что приводит к изменению экспрессии генов, контролирующих пролиферацию (MYC, CCND1) и индуцирующих апоптоз (BAX). Продемонстрирована высокая противоопухолевая активность пептида на клетки первичных опухолевых культур рака желудка. Важным результатом стало установление синергизма пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас») с классическими химиотерапевтическими средствами (этопозид, оксалиплатин, 5-фторурацил), что позволило усилить цитотоксический эффект и уменьшить используемые дозы традиционных препаратов.

Полученные в условиях *in vitro* данные подтвердили высокий потенциал пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас») как основы для разработки эффективного и селективного противоопухолевого препарата, а также

доказали возможность его комбинированного использования с существующими химиотерапевтическими агентами.

Доклинические исследования фармакологической активности ингибитора Ras-ГТФазы (K26K, «Инг-Рас») были проведены на ксенографтных моделях мышей линии BALB/c с подкожно трансплантированными опухолевыми клетками аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29) и легких (A549). Противоопухолевая эффективность препарата была изучена при внутрибрюшинном и внутривенном способах введения. Для оценки результатов применялись следующие методики: мониторинг динамики роста опухолей, гистологический анализ тканей, анализ выживаемости животных, протоколы многократного введения препарата, позволяющие объективно оценить лечебный эффект. Установлено, что на модели аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29) при обоих вариантах исследуемых доз пептидного ингибитора «Инг-Рас» (10 мг/кг и 20 мг/кг) происходило существенное торможение роста опухолевых узлов, достигающее более 50% при внутрибрюшинном введении. Несмотря на значительное сокращение размеров опухолей, разница между опытными и контрольными группами в продолжительности жизни животных была недостаточно велика для статистически значимых выводов. На модели рака лёгких (A549) аналогичные исследования выявили заметное увеличение средней продолжительности жизни животных, особенно при дозе 10 мг/кг, что также сопровождалось значительным сокращением объемов опухолей (до 57,3%).

По результатам проведенных экспериментальных исследований было установлено, что пептидный ингибитор Ras-ГТФазы продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность при внутривенном и локальном (внутрибрюшинном) способах введения. Также была определена оптимальная терапевтическая доза препарата 10 мг/кг, эквивалентная дозе для человека 1,6 мг/кг.

Доклинические исследования фармакокинетики ингибитора Ras-ГТФазы проведены при его внутривенном введении животным (самцам крыс линии SD и кроликам породы Калифорнийской) в трёх различных дозировках. Проводился

ежедневный мониторинг состояния животных и сбор биоматериала для последующего анализа концентраций препарата в плазме крови. Образцы крови брали из ушной вены у кроликов и катетеризированной сонной артерии у крыс, подвергая её обработке с использованием КЗ-ЭДТА и последующим хранением при низких температурах (-20°C) вплоть до начала анализов. Для измерения концентрации пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (К26К, «Инг-Рас») в плазме крови применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС), прошедшей необходимую валидацию. Методика была адаптирована и подтверждена с учетом необходимых этапов подготовки биологических образцов.

По основным результатам исследования выявлено быстрое снижение концентрации «Инг-Рас» в крови обоих видов животных. Так, спустя всего один час после инъекции пептидного ингибитора Ras-ГТФазы он практически исчезал из кровотока (концентрации становились ниже предела обнаружения), причём процесс снижения концентрации среди животных разных видов оказался схожим. Полученные фармакокинетические показатели продемонстрировали аналогичную реакцию организмов крыс и кроликов на введение препарата, хотя абсолютные значения некоторых характеристик незначительно различались. Так, период полувыведения $T_{1/2}$, средний промежуток пребывания препарата в организме, составил 4–5 минут, а среднее время нахождения препарата в организме (MRT) составляло приблизительно 5 минут у крыс и около 6 минут у кроликов. На основании проведенных исследований фармакокинетики было сделано заключение, что разработанный аналитический метод позволяет надежно определять динамику изменений концентрации пептидного ингибитора Ras-ГТФазы в крови млекопитающих. Результаты разработанного аналитического метода демонстрируют короткий период нахождения исследуемого пептида в организме и низкий уровень концентрационных различий среди отдельных особей.

Эксперименты по определению острой токсичности ингибитора Ras-ГТФазы были проведены при внутривенном и внутрибрюшинном введении мышам и крысам линии Sprague-Dawley в различных дозах с последующей

оценкой выживаемости, динамики симптомов интоксикации, изменения массы тела, потребления пищи, а также макроскопических изменений внутренних органов и тканей. Основной задачей исследования являлось выявление максимальной переносимой дозы (МПД) и дозы, не вызывающей неблагоприятных эффектов (NOAEL).

Результаты показали, что при внутривенном введении токсическое действие проявлялось при дозах препарата 60 мг/кг у крыс и 75 мг/кг у мышей и характеризовалось симптомами общей интоксикации (посинение конечностей, нарушения координации движений, респираторные расстройства). Клиническое состояние быстро ухудшалось, приводя к гибели в течение первых суток или позднее вследствие необратимых повреждений внутренних органов (например, кровоизлияния в тимус, легкие и сердце). Серьезные симптомы интоксикации отмечены при внутрибрюшинном введении препарата в группах, получавших высокие дозы, начиная с 250 мг/кг у крыс и 150 мг/кг у мышей. Основными клиническими признаками токсического воздействия являлись угнетенное поведение, снижение двигательной активности, цианоз и изменение формы тела. При анализе физиологических показателей выяснилось, что прирост массы тела существенно снижался лишь у самцов крыс, получавших низкие дозы препарата (60 и 30 мг/кг), тогда как суточное потребление корма оставалось стабильным во всех группах. Патолого-анатомические изменения выявили наличие кровоизлияний во внутренних органах, особенно выраженных при внутрибрюшинном пути введения высоких доз препарата. В группах животных, получающих препарат в дозах, не превышающих 50 мг/кг при внутривенном и 150 мг/кг при внутрибрюшинном способах введения, большинство проявлений имело временный характер и регрессировало после прекращения приема препарата.

Исходя из полученных в ходе исследования острой токсичности пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы (K26K, «Инг-Рас») данных, максимальная переносимая доза составила 50 мг/кг для крыс и 60 мг/кг для мышей. Доза, не вызывающая

неблагоприятных эффектов (NOAEL), определена только для внутрибрюшинного способа введения и соответствует 15 мг/кг.

Подостро-токсикологические исследования оценивали токсические эффекты лекарственного средства на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы (K26K, «Инг-Рас») при многократном внутривенном и внутрибрюшинном введениях крысам и кроликам разных полов. Введение препарата осуществлялось в течение 28 дней с последующей отменой на 14 дней в трёх экспериментальных дозах. Использовались стандартные подходы токсикологического анализа, включая мониторинг клинических симптомов, массу тела, потребление корма, лабораторные тесты крови и анатомическое вскрытие.

У крыс, получивших препарат внутривенно, отмечены минимальные клинические признаки токсичности, единичные случаи потери массы тела и некоторые изменения биохимических показателей крови, обратимые после отмены препарата. При внутрибрюшинном введении выявлены временные симптомы дискомфорта, особенно при максимальной дозе, незначительные изменения в динамике массы тела и питания. Лабораторные анализы и патологоанатомические исследования продемонстрировали незначительные отклонения в уровне мочевины и массе надпочечников, без выявленной связи с дозировкой препарата. У кроликов после внутривенного введения никаких существенных токсических и поведенческих реакций, изменений лабораторных и патологоанатомических показателей не обнаружено.

В результате проведенного исследования было сделано заключение о низком общем токсическом воздействии препарата при внутривенном способе введения в диапазоне доз от 8,6 мг/кг до 34,4 мг/кг и почти полном отсутствии токсического воздействия при внутрибрюшинном способе введения в дозах от 10 мг/кг до 90 мг/кг. Небольшие отклонения, выявленные при повышенных дозах, носили временный и ограниченный характер. Изучение подострой токсичности подтвердило безопасность использования пептидного ингибитора Ras-ГТФ-азы (K26K, «Инг-Рас») в пределах терапевтического диапазона доз.

Проведённые исследования специфической токсичности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы включали изучение мутагенного, аллергизирующего, иммунотоксического и раздражающего потенциалов вещества, а также проверку его пирогенности. Мутагенность изучалась посредством микроядерного теста на мышах и в экспериментах *in vitro* на клетках CHO-k1. Результаты исследований не подтвердили наличие мутагенного потенциала препарата. Аллергенность проверялась методами регистрации реакции общей анафилаксии, постановки реакции иммунных комплексов, метода конъюнктивальной пробы и непрямой дегрануляции тучных клеток. Доказано отсутствие аллергических реакций у животных при введении пептидного ингибитора Ras-ГТФазы. Иммунотоксичность устанавливалась путём оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа, иммунного ответа на стандарт-антиген и функциональной активности нейтрофилов. В результате проведенных исследований продемонстрировано отсутствие иммунотоксического воздействия препарата. Местное раздражающее воздействие было зафиксировано при повторном внутрибрюшинном введении крысам в дозе 90 мг/кг и проявлялось лишь в отдельных органах, не вызывая общих патологических изменений. Проверка пирогенности показала отсутствие температурных изменений у кроликов после однократного внутривенного введения препарата. Таким образом, полученные результаты позволили сделать выводы, что изучаемый препарат, пептидный ингибитор Ras-ГТФазы (K26KE, «Инг-Рас»), не проявляет значительных токсических, аллергизирующих, иммуносупрессивных или пирогенных эффектов.

На основании комплексного анализа токсикологического профиля было заключено, что препарат на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы при многократных внутривенных и внутрибрюшинных введениях не проявляет значимых токсичных эффектов в терапевтическом диапазоне доз и является безопасным кандидатом для последующего перехода к клиническим исследованиям.

Клинические испытания первой стадии (I/IIa фаза) были направлены на оценку фармакокинетики, безопасности и эффективности препарата «Инг-Рас», пептидного ингибитора Ras-ГТФазы, предназначенного для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта III-IV стадий с наличием или высоким риском развития перитонеального канцероматоза. В клиническом исследовании приняло участие 45 пациентов с подтвержденными диагнозами «С16 Злокачественное новообразование желудка» и «С20 Злокачественное новообразование (ЗНО) прямой кишки». В рамках I фазы клинических исследований 11 пациентов были разделены на 3 когорты в зависимости от вводимой дозировки препарата: 0,45 мг/кг, 0,9 мг/кг и 1,8 мг/кг. Введение препарата осуществлялось интраперитонеально с помощью метода внутрибрюшной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIRAC). Общая безопасность препарата была подтверждена отсутствием признаков дозолимитирующей токсичности и минимальной частотой серьёзных нежелательных явлений при всех исследуемых дозировках препарата «Инг-Рас». Средняя концентрация препарата в плазме крови была крайне низкой (менее 100 нг/мл), что подтверждает низкую системную абсорбцию и объясняет минимальное количество побочных эффектов. С учетом отсутствия случаев дозолимитирующей токсичности, во время первого этапа клинических исследований (Ia-фаза) была определена доза, составившая 1,8 мг/кг, рекомендуемая для перехода ко второму этапу клинических испытаний и продолжения оценки первичного терапевтического эффекта.

Во втором этапе (фаза IIa) в исследовании приняли участие 34 пациента. Была установлена благоприятная динамика безрецидивной и общей выживаемости пациентов, прошедших терапию препаратом «Инг-Рас». У пациентов с диагнозом «рак желудка» отмечена положительная тенденция безрецидивной выживаемости: медиана показателя составила 25,04 месяцев, что существенно превышает значение в группе исторического контроля (6,96 месяцев). Для пациентов с диагнозом «колоректальный рак» аналогичный показатель составил 17,85 месяцев – на 19,5% выше значения группы контроля. Средний срок общей одногодичной выживаемости пациентов, включенных в

исследование, после лечения препаратом «Инг-Рас» составил 97,5%, что почти вдвое превышает исторические данные. Значимым результатом является достоверное повышение на 29,07% ($p < 0,05$) значения показателя одногодичной безрецидивной выживаемости по сравнению с группой исторического контроля. Анализ результатов второго этапа клинических исследований (фаза IIa) подтвердил низкий профиль токсичности и высокую эффективность пептидного ингибитора Ras-ГТФазы препарата «Инг-Рас» при включении его в схему лечения пациентов с диагнозами «рак желудка» и «колоректальный рак». На основании полученных результатов I/IIa фазы доказана перспективность и актуальность препарата «Инг-Рас» на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы как потенциального противоопухолевого лекарственного средства.

Таким образом, на базе ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России разработана технология получения новых пептидных препаратов, основанная на концепции объединения функциональных и транспортных фрагментов, что обеспечивает высокоспецифичное воздействие на молекулярные мишени и улучшает внутриклеточное проникновение активных компонентов. В рамках данной технологии создан инновационный противоопухолевый препарат, пептидный ингибитор Ras-ГТФазы «Инг-Рас», доказавший высокую эффективность и безопасность в доклинических и первых фазах клинических исследованиях.

Проведенное исследование продемонстрировало перспективность новой технологии создания пептидных препаратов, направленно воздействующих на молекулярные мишени опухолевых клеток. Дальнейшее развитие данной стратегии предоставляет возможности для совершенствования методов лечения онкологических заболеваний, за счет включения в клиническую практику новых высокоэффективных таргетных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. На основании математического анализа трехмерных структур белковых комплексов и компьютерного моделирования их взаимодействия с химерными пептидными конструкциями разработан спектр пептидов, направленных на ингибирование белковых комплексов, ответственных за передачу митотического сигнала и канцерогенные свойства опухоли: Ras/Raf, Циклин D и Cdk4, Циклин A и Cdk2, E2F1/DP1, c-Myc/c-Max, c-Jun/c-Fos.

2. Экспериментальные исследования подтвердили высокую антипролиферативную и цитотоксическую активность созданных пептидных ингибиторов в отношении опухолевых клеток линий злокачественных новообразований различных локализаций.

3. Проведенные доклинические исследования пептидного ингибитора Ras-ГТФазы («Инг-Рас», K26K) доказали высокую эффективность в отношении опухолей различного происхождения, включая рак толстой кишки, легкого и рака желудка. При концентрации Инг-Рас 40 мкМоль, количество мертвых клеток увеличивается до $80 \pm 12,6\%$, уровень апоптоза увеличивается до $40 \pm 9,4\%$. Применение препарата «Инг-Рас» (K26K) в концентрации 10 мкМоль позволяет существенно снизить концентрации таких препаратов как оксалиплатин (до 0,1 нмоль), этопозид (до 1 мкмоль) и 5-фторурацил (до 1 мкмоль), сохраняя уровень апоптоза опухолевых клеток 80% ($p < 0,05$).

В исследованиях *in vivo* установлено, что применение «Инг-Рас» вызывает достоверное торможение роста опухоли (54,5%, $p < 0,05$) и увеличение выживаемости опытных животных с подкожно трансплантированными опухолями линий рака лёгкого (A549) - 36,3 % ($p < 0,01$) и рака толстой кишки (HT29) человека – 50,0% ($p < 0,05$).

4. Проведенный комплекс доклинических исследований безопасности препарата «Инг-Рас» подтвердил отсутствие серьёзных побочных эффектов при многократном внутривенном и внутрибрюшинном введении в дозах вплоть до 90 мг/кг. Отсутствие признаков токсичности дало основание рекомендовать переход к проведению клинических исследований.

5. Проведенное клиническое исследование I-IIa фазы показало хорошую переносимость и удовлетворительный профиль безопасности исследуемого препарата «Инг-Рас». Случаев дозолимитирующей токсичности не зафиксировано, выявленные нежелательные явления не имели установленной связи с введённым препаратом, частота серьезных нежелательных явлений составила 4,2% на первом этапе и 1,09% на втором этапе исследования.

6. Доказана первичная эффективность применения препарата «Инг-Рас» при внутрибрюшинном способе введения с помощью процедуры РІРАС у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта и повышенным риском развития перитонеального канцероматоза. Включённый в схемы комбинированной терапии, препарат увеличил показатель безрецидивной однолетней выживаемости на 29,07% ($p < 0,05$), что создаёт прочную базу для дальнейшего углублённого изучения и оценки эффективности препарата в последующих клинических исследованиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные пептидные последовательности, созданные на основе математического анализа и компьютерного моделирования, рекомендуется рассматривать как основу для разработки высокоэффективных ингибиторов ключевых внутриклеточных регуляторов канцерогенеза, включая регуляторы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Интернализуемые последовательности (CPPs) предлагается применять в качестве векторов внутриклеточной доставки высокомолекулярных соединений, что также может являться платформой для разработки новых классов таргетных лекарственных препаратов.

Препарат «Инг-Рас» первый российский пептидный ингибитор Ras-ГТФазы, отличающийся отсутствием аналогов и высокой эффективностью в отношении целого ряда онкологических патологий, включая немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак и другие виды солидного рака. Препарат обладает выраженным цитостатическим и цитотоксическим действием при одновременном сохранении низкого уровня неспецифической токсичности.

По результатам проведенных доклинических и начальных клинических исследований рекомендовано продолжить дальнейшее изучение препарата «Инг-Рас» в рамках IIb стадии клинических испытаний для оценки его эффективности и безопасности при лечении опухолей желудка и толстой кишки, а также для предотвращения и уменьшения риска развития перитонеального канцероматоза у пациентов с данным типом онкологических заболеваний.

Применение препарата «Инг-Рас» методом внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапией (PIRAC) представляется рациональным решением для повышения эффективности проводимой терапии и улучшения отдалённых результатов лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева, Е. С. Роль мутаций гена белка p53 в патогенезе хронического лимфоцитарного лейкоза / Е. С. Агеева, О. В. Штыгашева, А. Ю. Ивашкевич // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. — 2024. — Т. 14, № 3. — С. 35–42. — DOI: 10.29039/2224-6444-2024-14-3-35-42. — EDN: AQSRBS.
2. Артемьева, К. А. Экспрессия иммуноглобулинов в эпителиальных опухолях человека и их потенциальная роль в канцерогенезе / К. А. Артемьева, И. М. Богданова, М. Н. Болтовская, О. В. Калюжин // Бюллетень сибирской медицины. — 2021. — Т. 20, № 1. — С. 119–128. — DOI: 10.20538/1682-0363-2021-1-119-128.
3. Богданова, В. А. Современные представления о клинико-эпидемиологических и молекулярно-генетических особенностях меланомы кожи и слизистых / В. А. Богданова, Л. В. Спирина, С. Ю. Чижевская [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. — 2024. — Т. 11, № 1. — С. 22–30. — DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-1-22-30. — EDN: HCMFWW.
4. Гнатенко, Д. А. Роль сигнального пути FGF/FGFR в канцерогенезе поджелудочной железы / Д. А. Гнатенко, Е. П. Копанцев, Е. Д. Свердлов // Биомедицинская химия. — 2016. — Т. 62, № 6. — С. 622–629. — DOI: 10.18097/PBMS20166206622.
5. Гончаров, С. В. Анализ молекулярных фенотипов эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в нормальной слизистой оболочке и при колоректальном раке / С. В. Гончаров, В. К. Боженко, М. В. Захаренко // Альманах клинической медицины. — 2023. — Т. 51, № 8. — С. 441–455. — DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-046.
6. Гребенкин, Е. Н. Морфологические и молекулярно-генетические особенности рака желудка / Е. Н. Гребенкин, М. Б. Полянский, А. Н. Перепелевский [и др.] // Онкология. Журнал имени П. А. Герцена. — 2024. — Т. 13, № 3. — С. 79–84. — DOI: 10.17116/onkolog20241303179.
7. Игнатович, И. А. Механизм переноса комплексов ДНК/Tat в клетки млекопитающих / И. А. Игнатович, Э. Б. Диде, А. В. Павлоцкая [и др.] // Материалы XI Международной конференции. — 2003.
8. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2024 году (заболеваемость) / под ред. А. Д. Каприна [и др.]. — Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. — 178 с. — ISBN 978-5-85502-311-4.

9. Каприн, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. — Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. — 167 с.
10. Кит, О. И. Основные сигнальные пути, вовлеченные в патогенез онкологических заболеваний и психических нарушений / О. И. Кит, Л. Ю. Владимирова, С. В. Шпорт [и др.] // Российский психиатрический журнал. — 2023. — № 5. — С. 66–80. — DOI: 10.34757/1560-957X.2023.27.5.008.11.
11. Кит, О. И. Роль молекулярно-генетических исследований в современной онкологии / О. И. Кит, А. Ю. Максимов, Е. А. Дженкова, Н. Н. Тимошкина // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 214–224. — DOI: 10.15690/vgramn2034.
12. Кононенко, И. Б. Ингибиторы циклин-зависимых киназ: эффективность и безопасность / И. Б. Кононенко, А. В. Снеговой, В. Ю. Сельчук // МС. — 2019. — № 10.
13. Конопля, Н. Е. Цитогенетические изменения у пациентов с медуллобластомой и их прогностическое значение / Н. Е. Конопля, Е. В. Волочник, Т. В. Савич [и др.] // Евразийский онкологический журнал. — 2015. — № 2(5). — С. 45–52. — EDN: UKDZKL.
14. Куделина, О. М. Роль альтернативного сплайсинга в онкогенезе / О. М. Куделина, А. В. Сафроненко, М. Х. Б. Бураева [и др.] // Биомедицина. — 2024. — Т. 20, № 3. — С. 130–135. — DOI: 10.33647/2074-5982-20-3-130-135. — EDN: ВНСJPD.
15. Кушлинский, Н. Е. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований / Н. Е. Кушлинский, М. В. Немцова // Вестник РАМН. — 2014. — № 1–2.
16. Лебедев, Т. Д. Ингибирование ERK по-разному влияет на дифференцировку клеток нейробластомы, астроцитомы и рабдомиосаркомы / Т. Д. Лебедев, Э. Р. Вагапова, В. С. Прасолов // Acta Naturae (русскаяязычная версия). — 2021. — Т. 13, № 4. — С. 69–77. — DOI: 10.32607/actanaturae.11461. — EDN: ZVXUEW.
17. Лукмонов, С. Н. Хирургическое лечение или неoadьювантная химиотерапия при раке верхнеампулярного отдела прямой кишки: ретроспективное исследование / С. Н. Лукмонов, Я. В. Беленькая, С. С. Гордеев [и др.] // Злокачественные опухоли. — 2024. — Т. 14, № 1. — С. 9–20.

18. Майборода, А. А. Гены и белки онкогенеза / А. А. Майборода // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2013. — Т. 117, № 2. — С. 132–138. — EDN: QBSQUD.
19. Максимова, В. П. Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях / В. П. Максимова, О. Г. Усалка, Ю. В. Макусь [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. — 2022. — Т. 9, № 4. — С. 24–40. — DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-24-40. — EDN: SCIDNM20.
20. Максимова, П. Е. Колоректальный рак: эпидемиология, канцерогенез, молекулярно-генетические и клеточные механизмы резистентности к терапии (аналитический обзор) / П. Е. Максимова, Е. П. Голубинская, Б. Д. Сеферов, Е. Ю. Зяблицкая // Колопроктология. — 2023. — Т. 22, № 2(84). — С. 160–171. — DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-2-160-171.
21. Малащенко, В. В. Потенциальные мишени гепарина при прогрессировании и метастазировании злокачественных новообразований / В. В. Малащенко, И. А. Хлусов, К. А. Юрова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2024. — Т. 26, № 2. — С. 237–252. — DOI: 10.15789/1563-0625-PTO-2864. — EDN: MDAQBL.
22. Михаленко, Е. П. Сигнальные пути: механизм регуляции пролиферации и выживаемости опухолевых клеток / Е. П. Михаленко, А. Н. Щаяк, А. В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика. — 2019. — № 1. — URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/signalnye-puti-mehanizm-regulyatsii-proliferatsii-i-vyzhivaemosti-opuholevyh-kletok>.
23. Москалев, А. В. Роль вирусов в трансформации клеток и онкогенезе / А. В. Москалев, Б. Ю. Гумилевский, В. Я. Апчел, В. Н. Цыган // Вестник Российской Военно-медицинской академии. — 2023. — Т. 25, № 1. — С. 133–144. — DOI: 10.17816/brmma121327. — EDN: NRWFNM24.
24. Московцев, А. А. Клеточный стресс, старение и канцерогенез / А. А. Московцев, Д. М. Зайченко, П. К. Иванов, О. Н. Солопова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2023. — Т. 67, № 4. — С. 79–85. — DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.79-85.
25. Пузырева, Л. В. Генетический полиморфизм цитокинов: прошлое и будущее / Л. В. Пузырева, А. Д. Сафонов // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 2. — С. 103–108.
26. Радыгина, Л. В. Цитокины и рак желудка: клинические аспекты / Л. В. Радыгина // РМЖ. Медицинское обозрение. — 2024. — Т. 8, № 6. — С. 338–342. — DOI: 10.32364/2587-6821-2024-8-6-4.

27. Сазонов, С. В. Некоторые закономерности пролиферации клеток при старении организма и при развитии патологии / С. В. Сазонов // Гены и Клетки. — 2022. — Т. 17, № 3. — С. 203.
28. Сайт Биомолекула. Фармакогеномика: изучение генов на службе персонализированной медицины [Электронный ресурс]. — 14 июня 2019. — URL: <https://biomolecula.ru/articles/farmakogenomika-izuchenie-genov-na-sluzhbe-personalizirovannoi-meditsiny> (дата обращения: 14 февраля 2026 г.).
29. Семина, Е. В. МикроРНК в онкологии: от механизмов регуляции экспрессии генов до перепрограммирования метастатической ниши / Е. В. Семина, К. Д. Рысенкова, К. Э. Трояновский [и др.] // Биохимия. — 2021. — Т. 86, № 5. — С. 672–688. — DOI: 10.31857/S0320972521050055. — EDN: WAAJQT.
30. Солодкий, В. А. Особенности функционального состояния верхних отделов желудочно-кишечного тракта после различных вариантов гастрэктомий и проксимальных резекций желудка / В. А. Солодкий, В. А. Рагимов, В. Д. Чхиквадзе // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. — 2022. — Т. 22, № 1. — С. 76–92.
31. Сунь, Х. Результаты комбинированного лечения резектабельного рака желудка в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности / Х. Сунь, С. Н. Неред, А. А. Трякин [и др.] // Тазовая хирургия и онкология. — 2023. — Т. 13, № 2. — С. 17–26. — DOI: 10.17650/2686-9594-2023-13-2-17-26.
32. Тороповский, А. Н. Молекулярно-генетические механизмы сигнального каскада RAS-RAF-МЕК-ERK, связанные с развитием опухолевого процесса и назначением таргетных препаратов при колоректальном раке / А. Н. Тороповский, О. Н. Павлова, Д. А. Викторов, А. Г. Никитин // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье. — 2021. — № 4(52). — С. 25–35. — DOI: 10.20340/vmi-rvz.2021.4.MORPH.3.
33. Трофимов, Е. А. Безопасность биологической и таргетной терапии в отношении риска возникновения шести злокачественных новообразований / Е. А. Трофимов, В. И. Мазуров, С. А. Махортова [и др.] // Терапия. — 2025. — Т. 11, № 1(83). — С. 47–54. — DOI: 10.18565/therapy.2025.1.47-54.
34. Хабушева, Э. Р. Роль цитокинов в формировании устойчивости злокачественных клеток крови к ингибиторам рецепторных тирозинкиназ : дис. ... канд. биол. наук / Хабушева Эльмира Рамилевна. — 2022. — 138 с. — EDN: YGFIWY.
35. Чевкина, Е. М. Идентификация внутриклеточных сигнальных путей и функций белков, модулирующих процессы метастазирования и опухолевой

прогрессии : дис. ... докт. биол. наук / Чевкина Елена Максимовна. — 2014. — 294 с. — EDN: ABQWZO.

36. Четвериков, А. В. Роль иммунных контрольных точек в формировании опухолевой иммуносупрессии у больных со злокачественными новообразованиями / А. В. Четвериков, В. В. Крюкова, В. Л. Цепелев // Забайкальский медицинский вестник. — 2023. — № 4. — С. 77–88. — DOI: 10.52485/19986173_2023_4_77. — EDN: PZXTJO.

37. Шатова, О. П. Молекулярный оркестр микробиотических метаболитов в сценарии канцерогенеза / О. П. Шатова, А. А. Заболотнева, А. В. Шестопапов // Биохимия. — 2023. — Т. 88, № 7. — С. 1069–1084. — DOI: 10.31857/S0320972523070023.

38. Adagrasib (Krazati) for colorectal cancer / *Med Lett Drugs Ther.* — 2024. — Vol. 66, iss. 1709. — P. e137–e138. — DOI: 10.58347/tml.2024.1709f. — PMID: 39137178.

39. Adamopoulos, C., Papavassiliou, K. A., Poulikakos, P. I., Papavassiliou, A. G. RAF and MEK inhibitors in non-small cell lung cancer / *Int J Mol Sci.* — 2024. — Vol. 25, iss. 9. — Art. no. 4633. — Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/9/4633/pdf?version=1713959790>. — DOI: 10.3390/ijms25094633.

40. Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS / *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* — 2011. — Vol. 13, iss. 1. — P. 39–51. — DOI: 10.1038/nrm3255. — PMID: 22189424; PMCID: PMC3879958.

41. Aleem, E., Arceci, R. J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies / *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* — 2015. — Vol. 3. — Article no. 16. — DOI: 10.3389/fcell.2015.00016. — PMID: 25914884; PMCID: PMC4390903.

42. Ali, E. S., Akter, S., Ramproshad, S., Mondal, B., Riaz, T. A., Islam, M. T., Khan, I. N. et al. Targeting Ras-ERK cascade by bioactive natural products for potential treatment of cancer: an updated overview / *Cancer Cell International.* — 2022. — Vol. 22, No. 1. — From: <https://cancerci.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12935-022-02666-z>. — DOI: 10.1186/s12935-022-02666-z.

43. Alimohamadi, H., de Anda, J., Lee, M. W., Schmidt, N. W., Mandal, T., Wong, G. C. L. How cell-penetrating peptides behave differently from pore-forming peptides: structure and stability of induced transmembrane pores / *J Am Chem Soc.* — 2023. — Vol. 145, Iss. 48. — P. 26095–26105. — DOI: 10.1021/jacs.3c08014. — PMID: 37989570; PMCID: PMC11870675.

44. Alves, I. D., Jiao, C. Y., Aubry, S., Aussedat, B., Burlina, F., Chassaing, G., Sagan, S. Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells / *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2010. — Vol. 1798, Iss. 12. — P. 2231–2239. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.02.009. — PMID: 20152795.
45. Al-Ziftawi, N. H., Elazzazy, S., Alam, M. F., Shafie, A., Hamad, A., Bbujassoum, S., Mohamed Ibrahim, M. I. The effectiveness and safety of palbociclib and ribociclib in stage IV HR+/HER-2 negative breast cancer: a nationwide real-world comparative retrospective cohort study / *Frontiers in Oncology*. — 2023. — Vol. 13. — Art. no. 1203684. — DOI: 10.3389/fonc.2023.1203684.
46. Amin, S. M. S., Patil, P. H., Desai, M., Channabasavaiah, J. P. In silico design, synthesis and biological evaluation of 4-aryl-4H-chromene derivatives as CDK-2 inhibitors: a molecular approach to finding a lead for breast cancer / *J Appl Pharm Sci*. — 2024. — Vol. 14. — P. 98–111. — DOI: 10.7324/JAPS.2024.155052.
47. Armand, J., Kim, S., Kim, J. H., Son, E. L., Kim, M., Yang, H. W. Therapeutic benefits of maintaining CDK4/6 inhibitors and incorporating CDK2 inhibitors beyond progression in breast cancer / *Preprint*. — 2024. — DOI: 10.1101/2024.11.11.623139.
48. Arukuusk, P., Pärnaste, L., Margus, H., Eriksson, N. K., Vasconcelos, L., Padari, K., Pooga, M., Langel, U. Differential endosomal pathways for radically modified peptide vectors / *Bioconjugate Chemistry*. — 2013. — Vol. 24, Iss. 10. — P. 1721–1732. — DOI: 10.1021/bc4002757. — PMID: 23981119.
49. Asadian, Z., Zare, H., Aghaei, M., Panjehpour, M. Caveolae-dependent endocytosis mediates the cellular uptake of CdTe quantum dots in ovarian cancer cell lines / *Research in Pharmaceutical Sciences*. — 2022. — Vol. 17, Iss. 5. — P. 527–539. — DOI: 10.4103/1735-5362.355211. — PMID: 36386487; PMCID: PMC9661687.
50. Asl, E. R., Amini, M., Najafi, S., Mansoori, B., Mokhtarzadeh, A., Mohammadi, A., Lotfinejad, P., Bagheri, M., Shirjang, S., Lotfi, Z., Rasmi, Y., Baradaran, B. Interplay between MAPK/ERK signaling pathway and microRNAs: a crucial mechanism regulating cancer cell metabolism and tumor progression / *Life Sciences*. — 2021. — Vol. 278. — Art. no. 119499. — DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119499. — PMID: 33865878.
51. Athuluri-Divakar, S. K., Vasquez-Del Carpio, R., Dutta, K., Baker, S. J., Cosenza, S. C., Basu, I., Gupta, Y. K., Reddy, M. V., Ueno, L., Hart, J. R., Vogt, P. K., Mulholland, D., Guha, C., Aggarwal, A. K., Reddy, E. P. A small molecule RAS-mimetic disrupts RAS association with effector proteins to block signaling / *Cell*. —

2016. — Vol. 165, Iss. 3. — P. 643–655. — DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.045. — PMID: 27104980; PMCID: PMC5006944.
52. Avci, F. G., Akbulut, B. S., Özkirimli, E. Membrane active peptides and their biophysical characterization / *Biomolecules*. — 2018. — Vol. 8, Iss. 3. — Art. no. 77. — DOI: 10.3390/biom8030077. — PMID: 30135402; PMCID: PMC6164437.
53. Bahar, M. E., Kim, H. J., Kim, D. R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies / *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2023. — Vol. 8. — Art. no. 455. — DOI: 10.1038/s41392-023-01663-y.
54. Baier, A., Szyszka, R. CK2 and protein kinases of the CK1 superfamily as targets for neurodegenerative disorders / *Frontiers in Molecular Biosciences*. — 2022. — Vol. 9. — DOI: 10.3389/fmolb.2022.916063. — EDN: TJWEMK.
55. Balboa-Barreiro, V., Pérttega-Díaz, S., García-Rodríguez, T., et al. Colorectal cancer recurrence and its impact on survival after curative surgery: An analysis based on multistate models / *Dig Liver Dis*. — 2024 Jul. — Vol. 56, No. 7. — P. 1229-1236. — DOI: 10.1016/j.dld.2023.11.041.
56. Ball, K. L., Lain, S., Fâhraeus, R., et al. Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1 / *Curr Biol*. — 1997 Jan 1. — Vol. 7, No. 1. — P. 71-80. — DOI: 10.1016/s0960-9822(06)00029-7. — PMID: 8999999.
57. Ballestín, S., Labena, M. A., Avedillo-Salas, A., et al. Advances in CDK4/6 Inhibitors: Transforming Breast Cancer Treatment [Internet] / *Preprints*. — 2024 Dec 25. — DOI: 10.20944/preprints202412.2144.v1.
58. Baltanás, F. C., Zarich, N., Rojas-Cabañeros, J. M., Santos, E. SOS GEFs in health and disease / *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. — 2020 Dec. — Vol. 1874, No. 2. — Art. no. 188445. — DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188445. — Epub 2020 Oct 6. — PMID: 33035641.
59. Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial / *Lancet*. — 2010 Aug 28. — Vol. 376, No. 9742. — P. 687-97. — DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X. — Epub 2010 Aug 19. — Erratum in: *Lancet*. 2010 Oct 16;376(9749):1302. — PMID: 20728210.
60. Barbacid, M. ras genes / *Annu Rev Biochem*. — 1987. — Vol. 56. — P. 779-827. — DOI: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004023. — PMID: 3304147.

61. Bazzar, W., Bocci, M., Hejll, E., et al. Pharmacological inactivation of CDK2 inhibits MYC/BCL-XL-driven leukemia in vivo through induction of cellular senescence / *Cell Cycle*. — 2021 Jan. — Vol. 20, No. 1. — P. 23-38. — DOI: 10.1080/15384101.2020.1855740. — Epub 2020 Dec 27. — PMID: 33356836. — PMCID: PMC7849765.
62. Behzadipour, Y., Hemmati, S. Covalent conjugation and non-covalent complexation strategies for intracellular delivery of proteins using cell-penetrating peptides / *Biomed Pharmacother*. — 2024 Jul. — Vol. 176. — Art. no. 116910. — DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116910. — Epub 2024 Jun 8. — PMID: 38852512.
63. Bell, L., Ryan, K. Life and death decisions by E2F-1 / *Cell Death Differ*. — 2004. — Vol. 11. — P. 137–142.
64. Bellio, H., Fumet, J. D., Ghiringhelli, F. Targeting BRAF and RAS in Colorectal Cancer / *Cancers (Basel)*. — 2021 May 3. — Vol. 13, No. 9. — Art. no. 2201. — DOI: 10.3390/cancers13092201. — PMID: 34063682. — PMCID: PMC8124706.
65. Beltran, H., Prandi, D., Mosquera, J. M., et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer / *Nat Med*. — 2016 Mar. — Vol. 22, No. 3. — P. 298-305. — DOI: 10.1038/nm.4045. — Epub 2016 Feb 8. — PMID: 26855148. — PMCID: PMC4777652.
66. Bencivenga, D., Stampone, E., Aulitto, A., et al. A cancer-associated CDKN1B mutation induces p27 phosphorylation on a novel residue: a new mechanism for tumor suppressor loss-of-function / *Mol Oncol*. — 2021 Apr. — Vol. 15, No. 4. — P. 915-941. — DOI: 10.1002/1878-0261.12881. — Epub 2021 Feb 6. — PMID: 33316141. — PMCID: PMC8024736.
67. Bhal, S., Kundu, C. N. Targeting crosstalk of signaling pathways in cancer stem cells: a promising approach for development of novel anti-cancer therapeutics / *Med Oncol*. — 2023 Jan 20. — Vol. 40, No. 2. — Art. no. 82. — DOI: 10.1007/s12032-022-01905-7. — PMID: 36662310.
68. Bhatta, P., Hu, X. Molecular Determinants for Guanine Binding in GTP-Binding Proteins: A Data Mining and Quantum Chemical Study / *Int J Mol Sci*. — 2024 Nov 20. — Vol. 25, No. 22. — Art. no. 12449. — DOI: 10.3390/ijms252212449. — PMID: 39596514. — PMCID: PMC11594714.
69. Bodhale, N., Nair, A., Saha, B. Isoform-specific functions of Ras in T-cell development and differentiation / *Eur J Immunol*. — 2023 Jul. — Vol. 53, No. 7. — Art. no. e2350430. — DOI: 10.1002/eji.202350430. — Epub 2023 May 28. — PMID: 37173132.

70. Bonelli, M., La Monica, S., Fumarola, C., Alfieri, R. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation / *Biochem Pharmacol.* — 2019 Dec. — Vol. 170. — Art. no. 113676. — DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113676. — Epub 2019 Oct 21. — PMID: 31647925.
71. Borg, C., et al. Neoadjuvant mFOLFIRINOX and preoperative chemoradiation (CRT) versus preoperative CRT in patients with T3-4 rectal cancer: Surgical and quality of life results of PRODIGE 23 phase III trial [Abstract LBA21] / *Annals of Oncology.* — 2020. — Vol. 31, suppl. 4. — P. S1142-S1215. — DOI: 10.1016/annonc/annonc325.
72. Bottens, R. A., Yamada, T. Cell-Penetrating Peptides (CPPs) as Therapeutic and Diagnostic Agents for Cancer / *Cancers (Basel).* — 2022 Nov 11. — Vol. 14, No. 22. — Art. no. 5546. — DOI: 10.3390/cancers14225546. — PMID: 36428639. — PMCID: PMC9688740.
73. Braal, C. L., Jongbloed, E. M., Wilting, S. M., et al. Inhibiting CDK4/6 in breast cancer with palbociclib, ribociclib, and abemaciclib: similarities and differences / *Drugs.* — 2021. — Vol. 81. — P. 317–331. — DOI: 10.1007/s40265-020-01461-2.
74. Buhrman, G., Holzapfel, G., Fetics, S., Mattos, C. Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis / *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2010 Mar 16. — Vol. 107, No. 11. — P. 4931-6. — DOI: 10.1073/pnas.0912226107. — Epub 2010 Mar 1. — PMID: 20194776. — PMCID: PMC2841912.
75. Buhrman, G., O'Connor, C., Zerbe, B., et al. Analysis of binding site hot spots on the surface of Ras GTPase / *J Mol Biol.* — 2011 Nov 4. — Vol. 413, No. 4. — P. 773-89. — DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.011. — Epub 2011 Sep 16. — PMID: 21945529. — PMCID: PMC3247908.
76. Cai, Z., Moten, A., Peng, D., et al. The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy / *Semin Cancer Biol.* — 2020 Dec. — Vol. 67, Pt. 2. — P. 16-33. — DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.01.013. — Epub 2020 Feb 1. — PMID: 32014608. — PMCID: PMC9201937.
77. Cameron, D., Kumar Sharma, V., Biswas, C., et al. Cost-effectiveness of ribociclib versus palbociclib in combination with an aromatase inhibitor as first-line treatment of postmenopausal women with HR+/HER2- advanced breast cancer: analysis based on final OS results of MONALEESA-2 and PALOMA-2 / *J Med Econ.* — 2023. — Vol. 26. — P. 357–365. — DOI: 10.1080/13696998.2023.2182051.
78. Campanello, L., Traver, M. K., Shroff, H., et al. Signaling through polymerization and degradation: Analysis and simulations of T cell activation mediated by Bcl10 / *PLoS Comput Biol.* — 2021 May 20. — Vol. 17, No. 5. — Art. no.

e1007986. — DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007986. — PMID: 34014917. — PMCID: PMC8184007.

79. Campaner, S., Doni, M., Verrecchia, A., et al. Myc, Cdk2 and cellular senescence: Old players, new game / *Cell Cycle*. — 2010 Sep 15. — Vol. 9, No. 18. — P. 3655-61. — Epub 2010 Sep 15. — PMID: 20818171.

80. Carles, F., Bourg, S., Meyer, C., Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials / *Molecules*. — 2018 Apr 15. — Vol. 23, No. 4. — Art. no. 908. — DOI: 10.3390/molecules23040908. — PMID: 29662024. — PMCID: PMC6017449.

81. Carriere, A., Ray, H., Blenis, J., Roux, P. P. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade / *Front Biosci*. — 2008 May 1. — Vol. 13. — P. 4258-75. — DOI: 10.2741/3003. — PMID: 18508509.

82. Catenacci, D. V. T., Tebbutt, N. C., Davidenko, I., et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial / *Lancet Oncol*. — 2017 Nov. — Vol. 18, No. 11. — P. 1467-1482. — DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30566-1. — Epub 2017 Sep 25. — PMID: 28958504. — PMCID: PMC5898242.

83. Cejuela, M., Gil-Torralvo, A., Castilla, M., et al. Abemaciclib, palbociclib, and ribociclib in real-world data: a direct comparison of first-line treatment for endocrine-receptor-positive metastatic breast cancer / *Int J Mol Sci*. — 2023. — Vol. 24, No. 10. — Art. no. 8488. — DOI: 10.3390/ijms24108488.

84. Cerrato, C. P., Langel, Ü. An update on cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting / *Expert Opin Drug Deliv*. — 2022 Feb. — Vol. 19, No. 2. — P. 133-146. — DOI: 10.1080/17425247.2022.2034784. — Epub 2022 Feb 8. — PMID: 35086398.

85. Chakraborty, J., Chakraborty, S., Chakraborty, S., et al. Entanglement of MAPK pathways with gene expression and its omnipresence in the etiology for cancer and neurodegenerative disorders / *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. — 2023 Dec. — Vol. 1866, No. 4. — Art. no. 194988. — DOI: 10.1016/j.bbagr.2023.194988. — Epub 2023 Sep 21. — PMID: 37739217.

86. Chang, M., Huang, Y. W., Aronstam, R. S., Lee, H. J. Cellular delivery of noncovalently-associated macromolecules by cell-penetrating peptides / *Curr Pharm Biotechnol*. — 2014. — Vol. 15, No. 3. — P. 267-75. — DOI: 10.2174/1389201015666140617095415. — PMID: 24938892.

87. Cheng, K., Zhou, Z., Chen, Q., et al. CDK4/6 inhibition sensitizes MEK inhibition by inhibiting cell cycle and proliferation in pancreatic ductal adenocarcinoma / *Sci Rep.* — 2024 Apr 10. — Vol. 14, No. 1. — Art. no. 8389. — DOI: 10.1038/s41598-024-57417-z. — PMID: 38600093. — PMCID: PMC11006845.
88. Cheng, P. H., Rao, X. M., McMasters, K. M., Zhou, H. S. Molecular basis for viral selective replication in cancer cells: activation of CDK2 by adenovirus-induced cyclin E / *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, No. 2. — Art. no. e57340. — DOI: 10.1371/journal.pone.0057340. — Epub 2013 Feb 20. — PMID: 23437375. — PMCID: PMC3577715.
89. Cherfils, J., Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs / *Physiol Rev.* — 2013 Jan. — Vol. 93, No. 1. — P. 269-309. — DOI: 10.1152/physrev.00003.2012. — PMID: 23303910.
90. Chinenov, Y., Kerppola, T. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity / *Oncogene.* — 2001. — Vol. 20. — P. 2438–2452. — DOI: 10.1038/sj.onc.1204385.
91. Christiaens, B., Grooten, J., Reusens, M., et al. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides / *Eur. J. Biochemistry.* — 2004. — Vol. 271. — P. 1187-1197.
92. Coley, A. B., Ward, A., Prakash, A., et al. Pan-RAS inhibitors: Hitting multiple RAS isozymes with one stone / *Advances in Cancer Research.* — 2021. — Vol. 152. — DOI: 10.1016/bs.acr.2021.07.009.
93. Colombo, G. L., Valentino, M. C., Fabi, A., et al. Economic evaluation for palbociclib plus fulvestrant vs ribociclib plus fulvestrant and abemaciclib plus fulvestrant in endocrine-resistant advanced or metastatic breast cancer in Italy / *Ther Clin Risk Manag.* — 2023. — Vol. 19. — P. 301–312. — DOI: 10.2147/tcrm.s391769.
94. Cooper, G. M. Cellular transforming genes / *Science.* — 1982 Aug 27. — Vol. 217, No. 4562. — P. 801-6. — DOI: 10.1126/science.6285471. — PMID: 6285471.
95. Copolovici, D. M., Langel, K., Eriste, E., Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications / *ACS Nano.* — 2014 Mar 25. — Vol. 8, No. 3. — P. 1972-94. — DOI: 10.1021/nn4057269. — Epub 2014 Feb 28. — PMID: 24559246.
96. Corcoran, M. M., Mould, S. J., Orchard, J. A., et al. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations / *Oncogene.* — 1999 Nov 4. — Vol. 18, No. 46. — P. 6271-7. — DOI: 10.1038/sj.onc.1203033. — PMID: 10597225.

97. Cox, A. D., Der, C. J. "Undruggable KRAS": druggable after all / *Genes Dev.* — 2025 Jan 7. — Vol. 39, No. 1-2. — P. 132-162. — DOI: 10.1101/gad.352081.124. — PMID: 39638567. — PMCID: PMC11789494.
98. Cullen, P. J. Ras effectors: buying shares in Ras plc / *Curr Biol.* — 2001 May 1. — Vol. 11, No. 9. — P. R342-4. — DOI: 10.1016/s0960-9822(01)00189-0. — PMID: 11369243.
99. Dai, L., Zhuang, L., Zhang, B., et al. DAG/PKC δ and IP3/Ca²⁺/CaMK II β Operate in Parallel to Each Other in PLC γ 1-Driven Cell Proliferation and Migration of Human Gastric Adenocarcinoma Cells, through Akt/mTOR/S6 Pathway / *Int J Mol Sci.* — 2015 Dec 1. — Vol. 16, No. 12. — P. 28510-22. — DOI: 10.3390/ijms161226116. — PMID: 26633375. — PMCID: PMC4691063.
100. De Marco, C., Rinaldo, N., Bruni, P., et al. Multiple genetic alterations within the PI3K pathway are responsible for AKT activation in patients with ovarian carcinoma / *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, No. 2. — Art. no. e55362. — DOI: 10.1371/journal.pone.0055362. — Epub 2013 Feb 7. — PMID: 23408974. — PMCID: PMC3567053.
101. Degirmenci, U., Wang, M., Hu, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy / *Cells.* — 2020 Jan 13. — Vol. 9, No. 1. — Art. no. 198. — DOI: 10.3390/cells9010198. — PMID: 31941155. — PMCID: PMC7017232.
102. Denayer, E., Peeters, H., Sevenants, L., et al. NRAS Mutations in Noonan Syndrome / *Mol Syndromol.* — 2012 Jun. — Vol. 3, No. 1. — P. 34-38. — DOI: 10.1159/000338467. — Epub 2012 May 3. — PMID: 22855653. — PMCID: PMC3398822.
103. Deshayes, S., Gerbal-Chaloin, S., Morris, M. C., et al. On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids / *Biochim Biophys Acta.* — 2004 Dec 15. — Vol. 1667, No. 2. — P. 141-7. — DOI: 10.1016/j.bbame.2004.09.010. — PMID: 15581849.
104. Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C., et al. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis / *Biochemistry.* — 2004 Feb 17. — Vol. 43, No. 6. — P. 1449-57. — DOI: 10.1021/bi035682s. — PMID: 14769021.
105. Deshpande, S. H., Muhsinah, A. B., Bagewadi, Z. K., et al. In Silico Study on the Interactions, Molecular Docking, Dynamics and Simulation of Potential Compounds from *Withania somnifera* (L.) Dunal Root against Cancer by Targeting KAT6A / *Molecules.* — 2023 Jan 22. — Vol. 28, No. 3. — Art. no. 1117. — DOI: 10.3390/molecules28031117. — PMID: 36770785. — PMCID: PMC9920226.

106. Ding, Y., Su, H., Shu, Y., Chen, J. Post-marketing safety concerns of sotorasib: A disproportionality analysis based on FDA adverse event reporting system / *Heliyon*. — 2024 Apr 27. — Vol. 10, No. 9. — Art. no. e30437. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30437. — PMID: 38726179. — PMCID: PMC11079084.
107. Djakbarova, U., Madraki, Y., Chan, E. T., Kural, C. Dynamic interplay between cell membrane tension and clathrin-mediated endocytosis / *Biol Cell*. — 2021 Aug. — Vol. 113, No. 8. — P. 344-373. — DOI: 10.1111/boc.202000110. — Epub 2021 Apr 28. — PMID: 33788963. — PMCID: PMC8898183.
108. Doi, T., Piha-Paul, S. A., Jalal, S. I., et al. Updated results for the advanced esophageal carcinoma cohort of the Phase Ib KEYNOTE-028 study of pembrolizumab (MK-3475) / *J. Clin. Oncol.* — 2016. — Vol. 34, No. 4, Suppl. — P. 7.
109. Dolznig, H., Habermann, B., Stangl, K., et al. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts / *Curr Biol*. — 2002 Jul 9. — Vol. 12, No. 13. — P. 1076-85. — DOI: 10.1016/s0960-9822(02)00930-2. — PMID: 12121614.
110. Dong, G., Kogan, S., Venugopal, N., et al. Interleukin (IL)-1 Receptor Signaling Is Required for Complete Taste Bud Regeneration and the Recovery of Neural Taste Responses following Axotomy / *J Neurosci*. — 2023 May 10. — Vol. 43, No. 19. — P. 3439-3455. — DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1355-22.2023. — Epub 2023 Apr 4. — PMID: 37015809. — PMCID: PMC10184746.
111. Dong, X., Kong, L., Huang, L., et al. Ginsenoside Rg1 treatment protects against cognitive dysfunction via inhibiting PLC-CN-NFAT1 signaling in T2DM mice / *J Ginseng Res*. — 2023 May. — Vol. 47, No. 3. — P. 458-468. — DOI: 10.1016/j.jgr.2022.12.006. — Epub 2022 Dec 28. — PMID: 37252275. — PMCID: PMC10214300.
112. Dougherty, P. G., Sahni, A., Pei, D. Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides / *Chem Rev*. — 2019 Sep 11. — Vol. 119, No. 17. — P. 10241-10287. — DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00008. — Epub 2019 May 14. — PMID: 31083977. — PMCID: PMC6739158.
113. Dowaidar, M. Cell-penetrating peptides with nanoparticles hybrid delivery vectors and their uptake pathways / *Mitochondrion*. — 2024 Sep. — Vol. 78. — Art. no. 101906. — DOI: 10.1016/j.mito.2024.101906. — Epub 2024 May 24. — PMID: 38797356.
114. Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., et al. Stimulation of p21ras upon T-cell activation / *Nature*. — 1990 Aug 23. — Vol. 346, No. 6286. — P. 719-23. — DOI: 10.1038/346719a0. — PMID: 2201921.

115. Drin, G., Mazel, M., Clair, P., et al. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity / *Eur J Biochem.* — 2001 Mar. — Vol. 268, No. 5. — P. 1304-14. — DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.01997.x. — PMID: 11231282.
116. Du, J. J., Zhang, R. Y., Jiang, S., et al. Applications of cell penetrating peptide-based drug delivery system in immunotherapy / *Front Immunol.* — 2025 Jan 22. — Vol. 16. — Art. no. 1540192. — DOI: 10.3389/fimmu.2025.1540192. — PMID: 39911386. — PMCID: PMC11794548.
117. Duan, Y., Liu, Z., Wang, Q., et al. Targeting MYC: Multidimensional regulation and therapeutic strategies in oncology / *Genes Dis.* — 2024 Sep 16. — Vol. 12, No. 4. — Art. no. 101435. — DOI: 10.1016/j.gendis.2024.101435. — PMID: 40290126. — PMCID: PMC12022651.
118. Dutton, S. J., Ferry, D. R., Blazeby, J. M., et al. Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG): a phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial / *Lancet Oncol.* — 2014 Jul. — Vol. 15, No. 8. — P. 894-904. — DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70024-5. — Epub 2014 Jun 17. — PMID: 24950987.
119. Edaibis, R., Akel, R., Shin, J. A. Beyond small molecules: advancing MYC-targeted cancer therapies through protein engineering / *Transcription.* — 2025 Feb. — Vol. 16, No. 1. — P. 67-85. — DOI: 10.1080/21541264.2025.2453315. — Epub 2025 Jan 29. — PMID: 39878458. — PMCID: PMC11970745.
120. Engeland, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling / *Cell Death Differ.* — 2022 May. — Vol. 29, No. 5. — P. 946-960. — DOI: 10.1038/s41418-022-00988-z. — Epub 2022 Mar 31. — PMID: 35361964. — PMCID: PMC9090780.
121. Esquivel, J., Lowy, A. M., Markman, M., et al. The American Society of Peritoneal Surface Malignancies (ASPSM) Multiinstitution Evaluation of the Peritoneal Surface Disease Severity Score (PSDSS) in 1,013 Patients with Colorectal Cancer with Peritoneal Carcinomatosis / *Ann Surg Oncol.* — 2014. — Vol. 21. — P. 4195–4201.
122. Farahani, P. E., Lemke, S. B., Dine, E., et al. Substratum stiffness regulates Erk signaling dynamics through receptor-level control / *Cell Rep.* — 2021 Dec 28. — Vol. 37, No. 13. — Art. no. 110181. — DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110181. — PMID: 34965432. — PMCID: PMC8756379.
123. Fedyanin, M., Polyanskaya, E., Elsnukaeva, H., et al. FOLFOXIRI versus FOLFOX or FOLFIRI with targeted therapy in patients with mutant BRAF metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis / *Meditinskii sovet. Medical*

Council. — 2020. — No. 20. — P. 125-132. — DOI: 10.21518/2079-701X-2020-20-125-132.

124. Filchtinski, D., Sharabi, O., Ruppel, A., et al. What makes Ras an efficient molecular switch: a computational, biophysical, and structural study of Ras-GDP interactions with mutants of Raf / *J Mol Biol.* — 2010 Jun 11. — Vol. 399, No. 3. — P. 422-35. — DOI: 10.1016/j.jmb.2010.03.046. — Epub 2010 Mar 31. — PMID: 20361980.

125. Fontanella, C., Giorgi, C. A., Russo, S., et al. Optimizing CDK4/6 inhibitors in advanced HR+/HER2- breast cancer: A personalized approach / *Crit Rev Oncol Hematol.* — 2022. — Vol. 180. — Art. no. 103848. — DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103848.

126. Frau, M., Feo, F., Pascale, R. M. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis / *J Hepatol.* — 2013 Oct. — Vol. 59, No. 4. — P. 830-41. — DOI: 10.1016/j.jhep.2013.04.031. — Epub 2013 May 7. — PMID: 23665184.

127. Fuchs, C. S., Shitara, K., Di Bartolomeo, M., et al. Ramucirumab with cisplatin and fluoropyrimidine as first-line therapy in patients with metastatic gastric or junctional adenocarcinoma (RAINFALL): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / *Lancet Oncol.* — 2019 Mar. — Vol. 20, No. 3. — P. 420-435. — DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30791-5. — Epub 2019 Feb 1. — Erratum in: *Lancet Oncol.* 2019 May;20(5):e242. — PMID: 30718072.

128. Futaki, S., Hirose, H., Nakase, I. Arginine-rich peptides: methods of translocation through biological membranes / *Curr Pharm Des.* — 2013. — Vol. 19, No. 16. — P. 2863-8. — DOI: 10.2174/1381612811319160003. — PMID: 23140459.

129. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery / *J Biol Chem.* — 2001 Feb 23. — Vol. 276, No. 8. — P. 5836-40. — DOI: 10.1074/jbc.M007540200. — Epub 2000 Nov 17. — PMID: 11084031.

130. Gao, F., Thornley, B. S., Tressler, C. M., et al. Phosphorylation-dependent protein design: design of a minimal protein kinase-inducible domain / *Org Biomol Chem.* — 2019 Apr 17. — Vol. 17, No. 16. — P. 3984-3995. — DOI: 10.1039/c9ob00502a. — PMID: 30942803. — PMCID: PMC6668337.

131. Gerbal-Chaloin, S., Gondeau, C., Aldrian-Herrada, G., et al. First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling / *Biol Cell.* — 2007 Apr. — Vol. 99, No. 4. — P. 223-38. — DOI: 10.1042/BC20060123. — PMID: 17233629.

132. Gigoux, V., L'Hoste, S., Raynaud, F., et al. Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins / *J Biol Chem.* — 2002 Jun 28. — Vol. 277, No. 26. — P. 23742-6. — DOI: 10.1074/jbc.C200121200. — Epub 2002 Apr 25. — PMID: 11976319.
133. Giubellino, A., Burke, T. R. Jr., Bottaro, D. P. Grb2 signaling in cell motility and cancer / *Expert Opin Ther Targets.* — 2008 Aug. — Vol. 12, No. 8. — P. 1021-33. — DOI: 10.1517/14728222.12.8.1021. — PMID: 18620523. — PMCID: PMC2764957.
134. Goitre, L., Trapani, E., Trabalzini, L., Retta, S. F. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets / *Methods Mol Biol.* — 2014. — Vol. 1120. — P. 1-18. — DOI: 10.1007/978-1-62703-791-4_1. — PMID: 24470015.
135. Gomez-Gutierrez, P., Rubio-Martinez, J., Perez, J. J. Discovery of Hit Compounds Targeting the P4 Allosteric Site of K-RAS, Identified through Ensemble-Based Virtual Screening / *J Chem Inf Model.* — 2023 Oct 23. — Vol. 63, No. 20. — P. 6412-6422. — DOI: 10.1021/acs.jcim.3c01212. — Epub 2023 Oct 12. — PMID: 37824186. — PMCID: PMC10598794.
136. Goyal, R. K., Chen, H., Abughosh, S. M., et al. Overall survival associated with CDK4/6 inhibitors in patients with HR+/HER2- metastatic breast cancer in the United States: A SEER-Medicare population-based study / *Cancer.* — 2023. — Vol. 129. — P. 1051–1063. — DOI: 10.1002/cncr.34675.
137. Gray, J. L., von Delft, F., Brennan, P. E. Targeting the Small GTPase Superfamily through Their Regulatory Proteins / *Angew Chem Int Ed Engl.* — 2020 Apr 16. — Vol. 59, No. 16. — P. 6342-6366. — DOI: 10.1002/anie.201900585. — Epub 2020 Jan 30. — PMID: 30869179. — PMCID: PMC7204875.
138. Groenland, S. L., Martínez-Chávez, A., van Dongen, M. G. J., et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors palbociclib, ribociclib, and abemaciclib / *Clin Pharmacokinet.* — 2020. — Vol. 59. — P. 1501–1520. — DOI: 10.1007/s40262-020-00930-x.
139. Guo, A. Y., Zhai, K., Xu, J. L., et al. Identification of a Low-Frequency Missense Variant in E2F Transcription Factor 7 Associated with Colorectal Cancer Risk In A Chinese Population / *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2017 Jan 1. — Vol. 18, No. 1. — P. 271-275. — DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.271. — PMID: 28240846. — PMCID: PMC5563112.
140. Guo, E., Xiao, R., Wu, Y., et al. WEE1 inhibition induces anti-tumor immunity by activating ERV and the dsRNA pathway / *J Exp Med.* — 2022 Jan 3. — Vol. 219, No. 1. — Art. no. e20210789. — DOI: 10.1084/jem.20210789. — Epub 2021 Nov 26. — PMID: 34825915. — PMCID: PMC8628262.

141. Gupta, A., Dagar, G., Chauhan, R., et al. Cyclin-dependent kinases in cancer: Role, regulation, and therapeutic targeting / *Adv Protein Chem Struct Biol.* — 2023. — Vol. 135. — P. 21-55. — DOI: 10.1016/bs.apcsb.2023.02.001. — Epub 2023 Mar 16. — PMID: 37061333.
142. Habault, J., Poyet, J. L. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies / *Molecules.* — 2019 Mar 7. — Vol. 24, No. 5. — Art. no. 927. — DOI: 10.3390/molecules24050927. — PMID: 30866424. — PMCID: PMC6429072.
143. Han, Y. H., Wang, Y., Lee, S. J., et al. Regulation of anoikis by extrinsic death receptor pathways / *Cell Commun Signal.* — 2023 Sep 4. — Vol. 21, No. 1. — Art. no. 227. — DOI: 10.1186/s12964-023-01247-5. — PMID: 37667281. — PMCID: PMC10478316.
144. Hao, M., Zhang, L., Chen, P. Membrane Internalization Mechanisms and Design Strategies of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides / *Int J Mol Sci.* — 2022 Aug 12. — Vol. 23, No. 16. — Art. no. 9038. — DOI: 10.3390/ijms23169038. — PMID: 36012300. — PMCID: PMC9409441.
145. Harvey, J. J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice / *Nature.* — 1964 Dec 12. — Vol. 204. — P. 1104-5. — DOI: 10.1038/2041104b0. — PMID: 14243400.
146. Hassanzadeh, A., Shomali, N., Kamrani, A., et al. Cancer therapy by cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs): bench to bedside / *EXCLI J.* — 2024 Jun 4. — Vol. 23. — P. 862-882. — DOI: 10.17179/excli2024-7076. — PMID: 38983782. — PMCID: PMC11231458.
147. Hawash, M. Advances in Cancer Therapy: A Comprehensive Review of CDK and EGFR Inhibitors / *Cells.* — 2024 Oct 6. — Vol. 13, No. 19. — Art. no. 1656. — DOI: 10.3390/cells13191656. — PMID: 39404419. — PMCID: PMC11476325.
148. Heath, S. G., Naughton, J. D., Magon, N. J., et al. Characterizing the amyloid core region of the tumor suppressor protein p16INK4a using a limited proteolysis and peptide-based approach / *J Biol Chem.* — 2024 Aug. — Vol. 300, No. 8. — Art. no. 107590. — DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107590. — Epub 2024 Jul 18. — PMID: 39032649. — PMCID: PMC11375262.
149. Helt, A. M., Funk, J. O., Galloway, D. A. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells / *J Virol.* — 2002 Oct. — Vol. 76, No. 20. — P. 10559-68. — DOI: 10.1128/jvi.76.20.10559-10568.2002. — PMID: 12239337. — PMCID: PMC136576.

150. Henriques, J., Lindorff-Larsen, K. Protein Dynamics Enables Phosphorylation of Buried Residues in Cdk2/Cyclin-A-Bound p27 / *Biophys J.* — 2020 Nov 17. — Vol. 119, No. 10. — P. 2010-2018. — DOI: 10.1016/j.bpj.2020.06.040. — Epub 2020 Oct 14. — PMID: 33147476. — PMCID: PMC7732742.
151. Hidalgo, F., Nocka, L. M., Shah, N. H., et al. A saturation-mutagenesis analysis of the interplay between stability and activation in Ras / *Elife.* — 2022 Mar 11. — Vol. 11. — Art. no. e76595. — DOI: 10.7554/eLife.76595. — PMID: 35272765. — PMCID: PMC8916776.
152. Hirase, S., Aoki, A., Hattori, Y., et al. Dodecaborate-Encapsulated Extracellular Vesicles with Modification of Cell-Penetrating Peptides for Enhancing Macropinocytotic Cellular Uptake and Biological Activity in Boron Neutron Capture Therapy / *Mol Pharm.* — 2022 Apr 4. — Vol. 19, No. 4. — P. 1135-1145. — DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00882. — Epub 2022 Mar 17. — PMID: 35298163.
153. Híveš, M., Jurečeková, J., Kliment, J., et al. Role of Genetic Variations in CDK2, CCNE1 and p27KIP1 in Prostate Cancer / *Cancer Genomics Proteomics.* — 2022 May-Jun. — Vol. 19, No. 3. — P. 362-371. — DOI: 10.21873/cgp.20326. — PMID: 35430569. — PMCID: PMC9016479.
154. Hofmann, M. H., Gerlach, D., Misale, S., et al. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants / *Cancer Discov.* — 2022 Apr 1. — Vol. 12, No. 4. — P. 924-937. — DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1331. — PMID: 35046095. — PMCID: PMC9394389.
155. Hong, T., Hogger, A. C., Wang, D., et al. CDK4/6 Inhibition Initiates Cell Cycle Arrest by Nuclear Translocation of RB and Induces a Multistep Molecular Response / *Cell Death Discovery.* — 2024 Oct 26. — Vol. 10, No. 1. — Art. no. 453. — DOI: 10.1038/s41420-024-02218-6.
156. Hossain, Md. A. Targeting the RAS Upstream and Downstream Signaling Pathway for Cancer Treatment / *European Journal of Pharmacology.* — 2024 Jun 1. — Art. no. 176727. — DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176727.
157. Hoyer, J., Neundorff, I. Peptide vectors for the nonviral delivery of nucleic acids / *Acc Chem Res.* — 2012 Jul 17. — Vol. 45, No. 7. — P. 1048-56. — DOI: 10.1021/ar2002304. — Epub 2012 Mar 28. — PMID: 22455499.
158. Erk Signaling Pathway [Electronic resource] / Creative Diagnostics. — URL: <https://www.creative-diagnostics.com/Erk-Signaling-Pathway.htm> (access date: ...).
159. U.S. Cancer Statistics: Data Visualizations [Electronic resource] / Centers for Disease Control and Prevention. — URL: <https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/#/Survival> (access date: ...).

160. Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer [Electronic resource] / National Cancer Institute. — URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> (access date: ...).
161. Hu, W., Cai, W., Wu, Y., et al. Topical Application of Cell-Penetrating Peptide Modified Anti-VEGF Drug Alleviated Choroidal Neovascularization in Mice / *Int J Nanomedicine*. — 2024 Jan 3. — Vol. 19. — P. 35-51. — DOI: 10.2147/IJN.S428684. — PMID: 38187905. — PMCID: PMC10771783.
162. Huang, S., Wang, J., Zhang, L., et al. Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 promotes renal inflammatory injury in type 2 diabetes mellitus / *Metabolism*. — 2022 Jun. — Vol. 131. — Art. no. 155177. — DOI: 10.1016/j.metabol.2022.155177. — Epub 2022 Feb 23. — PMID: 35218794.
163. Huber, K., Mestres-Arenas, A., Fajas, L., Leal-Esteban, L. C. The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism / *FEBS J*. — 2021 Jun. — Vol. 288, No. 12. — P. 3813-3833. — DOI: 10.1111/febs.15586. — Epub 2020 Oct 25. — PMID: 33030287. — PMCID: PMC8359344.
164. Huiyan, L., Wang, Z., Lin, W., et al. RAS mutation clearance in patients with metastatic colorectal cancer / *Annals of Oncology*. — 2020. — Vol. 31, 4S(444).
165. Hunter, J. C., Manandhar, A., Carrasco, M. A., et al. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations / *Mol Cancer Res*. — 2015 Sep. — Vol. 13, No. 9. — P. 1325-35. — DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203. — Epub 2015 Jun 2. — PMID: 26037647.
166. Hydbring, P., Larsson, L. G. Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc / *Aging (Albany NY)*. — 2010 Apr. — Vol. 2, No. 4. — P. 244-50. — DOI: 10.18632/aging.100140. — PMID: 20445224. — PMCID: PMC2881513.
167. Hydbring, P., Malumbres, M., Sicinski, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases / *Nat Rev Mol Cell Biol*. — 2016 May. — Vol. 17, No. 5. — P. 280-92. — DOI: 10.1038/nrm.2016.27. — Epub 2016 Apr 1. — PMID: 27033256. — PMCID: PMC4841706.
168. Hymel, H. C., Rahnema, A., Sanchez, O. M., et al. How Cargo Identity Alters the Uptake of Cell-Penetrating Peptide (CPP)/Cargo Complexes: A Study on the Effect of Net Cargo Charge and Length / *Cells*. — 2022 Apr 1. — Vol. 11, No. 7. — Art. no. 1195. — DOI: 10.3390/cells11071195. — PMID: 35406759. — PMCID: PMC8997848.
169. Isermann, T., Sers, C., Der, C. J., Papke, B. KRAS inhibitors: resistance drivers and combinatorial strategies / *Trends Cancer*. — 2025 Feb. — Vol. 11, No. 2. — P. 91-116. — DOI: 10.1016/j.trecan.2024.11.009. — Epub 2024 Dec 27. — PMID: 39732595.

170. Jang, H., Muratcioglu, S., Gursoy, A., et al. Membrane-associated Ras dimers are isoform-specific: K-Ras dimers differ from H-Ras dimers / *Biochem J.* — 2016 Jun 15. — Vol. 473, No. 12. — P. 1719-32. — DOI: 10.1042/BCJ20160031. — Epub 2016 Apr 7. — PMID: 27057007. — PMCID: PMC7830773.
171. Jang, H., Zhang, M., Nussinov, R. The quaternary assembly of KRas4B with Raf-1 at the membrane / *Comput Struct Biotechnol J.* — 2020 Mar 25. — Vol. 18. — P. 737-748. — DOI: 10.1016/j.csbj.2020.03.018. — PMID: 32257057. — PMCID: PMC7125320.
172. Jang, H., Zhang, M., Nussinov, R. The quaternary assembly of KRas4B with Raf-1 at the membrane / *Comput Struct Biotechnol J.* — 2020 Mar 25. — Vol. 18. — P. 737-748. — DOI: 10.1016/j.csbj.2020.03.018. — PMID: 32257057. — PMCID: PMC7125320.
173. Janjigian, Y. Y., Shitara, K., Moehler, M., et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial / *Lancet.* — 2021 Jul 3. — Vol. 398, No. 10294. — P. 27-40. — DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
174. Janicot, R., Maziarz, M., Park, J. C., et al. Direct interrogation of context-dependent GPCR activity with a universal biosensor platform / *Cell.* — 2024 Mar 14. — Vol. 187, No. 6. — P. 1527-1546.e25. — DOI: 10.1016/j.cell.2024.01.028. — Epub 2024 Feb 26. — PMID: 38412860. — PMCID: PMC10947893.
175. Jänne, P. A., Riely, G. J., Gadgeel, S. M., et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation / *N Engl J Med.* — 2022 Jul 14. — Vol. 387, No. 2. — P. 120-131. — DOI: 10.1056/NEJMoa2204619. — Epub 2022 Jun 3. — PMID: 35658005.
176. Johnson, C. W., Fetics, S. K., Davis, K. P., et al. Allosteric site variants affect GTP hydrolysis on Ras / *Protein Sci.* — 2023 Oct. — Vol. 32, No. 10. — Art. no. e4767. — DOI: 10.1002/pro.4767. — PMID: 37615343. — PMCID: PMC10510474.
177. Johnson, K. C., Tien, A. C., Jiang, J., et al. Single nucleus transcriptomics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of combined CDK4/6 and mTOR inhibition in a phase 0/1 trial of recurrent high-grade glioma / *medRxiv [Preprint]*. — 2024 Jun 7. — Art. no. 2024.06.07.24308439. — DOI: 10.1101/2024.06.07.24308439. — PMID: 38883740. — PMCID: PMC11178017.
178. Jones, S. W., Christison, R., Bundell, K., et al. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery / *Br J Pharmacol.* — 2005 Aug. — Vol.

145, No. 8. — P. 1093-102. — DOI: 10.1038/sj.bjp.0706279. — PMID: 15937518. — PMCID: PMC1576229.

179. Joshi, S. S., Maron, S. B., Catenacci, D. V. Pembrolizumab for treatment of advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma / *Future Oncol.* — 2018 Feb. — Vol. 14, No. 5. — P. 417-430. — DOI: 10.2217/fon-2017-0436.

180. Jusino, S., Saavedra, H. I. Role of E2Fs and mitotic regulators controlled by E2Fs in the epithelial to mesenchymal transition / *Exp Biol Med (Maywood)*. — 2019 Nov. — Vol. 244, No. 16. — P. 1419-1429. — DOI: 10.1177/1535370219881360. — Epub 2019 Oct 1. — PMID: 31575294. — PMCID: PMC6900705.

181. Kalafatovic, D., Giralt, E. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity / *Molecules*. — 2017 Nov 8. — Vol. 22, No. 11. — Art. no. 1929. — DOI: 10.3390/molecules22111929. — PMID: 29117144. — PMCID: PMC6150340.

182. Kalinsky, K., Bianchini, G., Hamilton, E., et al. Abemaciclib Plus Fulvestrant in Advanced Breast Cancer After Progression on CDK4/6 Inhibition: Results From the Phase III postMONARCH Trial / *J Clin Oncol.* — 2025 Mar 20. — Vol. 43, No. 9. — P. 1101-1112. — DOI: 10.1200/JCO-24-02086. — Epub 2024 Dec 18. — PMID: 39693591. — PMCID: PMC11936477.

183. Kalous, J., Jansová, D., Šušor, A. Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Translational Regulation in the M-Phase / *Cells*. — 2020 Jun 27. — Vol. 9, No. 7. — Art. no. 1568. — DOI: 10.3390/cells9071568. — PMID: 32605021. — PMCID: PMC7408968.

184. Kanemitsu, Y., Shitara, K., Mizusawa, J., et al. Primary Tumor Resection Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone for Colorectal Cancer Patients With Asymptomatic, Synchronous Unresectable Metastases (JCOG1007; iPACS): A Randomized Clinical Trial / *J Clin Oncol.* — 2021 Apr 1. — Vol. 39, No. 10. — P. 1098-1107. — DOI: 10.1200/JCO.20.02447. — Epub 2021 Feb 9. — PMID: 33560877. — PMCID: PMC8078424.

185. Kang, J., Sergio, C. M., Sutherland, R. L., Musgrove, E. A. Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells / *BMC Cancer*. — 2014 Jan 20. — Vol. 14. — Art. no. 32. — DOI: 10.1186/1471-2407-14-32. — PMID: 24444383. — PMCID: PMC3903446.

186. Kapoor, A., Travesset, A. Differential dynamics of RAS isoforms in GDP- and GTP-bound states / *Proteins*. — 2015 Jun. — Vol. 83, No. 6. — P. 1091-106. — DOI: 10.1002/prot.24805. — Epub 2015 Apr 22. — PMID: 25846136.

187. Karakas, C., Biernacka, A., Bui, T., et al. Cytoplasmic Cyclin E and Phospho-Cyclin-Dependent Kinase 2 Are Biomarkers of Aggressive Breast Cancer / *Am J Pathol.* — 2016 Jul. — Vol. 186, No. 7. — P. 1900-1912. — DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.02.024. — Epub 2016 May 13. — PMID: 27182644. — PMCID: PMC4929404.
188. Kardani, K., Milani, A., H Shabani, S., Bolhassani, A. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers / *Expert Opin Drug Deliv.* — 2019 Nov. — Vol. 16, No. 11. — P. 1227-1258. — DOI: 10.1080/17425247.2019.1676720. — Epub 2019 Oct 15. — PMID: 31583914.
189. Kashyap, D., Garg, V. K., Sandberg, E. N., et al. Oncogenic and Tumor Suppressive Components of the Cell Cycle in Breast Cancer Progression and Prognosis / *Pharmaceutics.* — 2021 Apr 17. — Vol. 13, No. 4. — Art. no. 569. — DOI: 10.3390/pharmaceutics13040569. — PMID: 33920506. — PMCID: PMC8072616.
190. Kasprzak, A. Prognostic Biomarkers of Cell Proliferation in Colorectal Cancer (CRC): From Immunohistochemistry to Molecular Biology Techniques / *Cancers (Basel).* — 2023 Sep 15. — Vol. 15, No. 18. — Art. no. 4570. — DOI: 10.3390/cancers15184570. — PMID: 37760539. — PMCID: PMC10526446.
191. Kauffman, W. B., Fuselier, T., He, J., Wimley, W. C. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides / *Trends Biochem Sci.* — 2015 Dec. — Vol. 40, No. 12. — P. 749-764. — DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.004. — Epub 2015 Nov 3. — PMID: 26545486. — PMCID: PMC4727446.
192. Kawaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuwata, K., et al. Syndecan-4 Is a Receptor for Clathrin-Mediated Endocytosis of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides / *Bioconjug Chem.* — 2016 Apr 20. — Vol. 27, No. 4. — P. 1119-30. — DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00082. — Epub 2016 Apr 5. — PMID: 27019270.
193. Kazeminein Jasemi, N. S., Ahmadian, M. R. Allosteric regulation of GRB2 modulates RAS activation / *Small GTPases.* — 2022 Jan. — Vol. 13, No. 1. — P. 282-286. — DOI: 10.1080/21541248.2022.2089001. — PMID: 35703160. — PMCID: PMC9225496.
194. Kearney, B. M., Johnson, C. W., Roberts, D. M., et al. DRoP: a water analysis program identifies Ras-GTP-specific pathway of communication between membrane-interacting regions and the active site / *J Mol Biol.* — 2014 Feb 6. — Vol. 426, No. 3. — P. 611-29. — DOI: 10.1016/j.jmb.2013.10.036. — Epub 2013 Nov 2. — PMID: 24189050.
195. Keiper, M., Stope, M. B., Szatkowski, D., et al. Epac- and Ca²⁺-controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors / *J*

- Biol Chem. — 2004 Nov 5. — Vol. 279, No. 45. — P. 46497-508. — DOI: 10.1074/jbc.M403604200. — Epub 2004 Aug 19. — PMID: 15319437.
196. Kemp, Z., Rowan, A., Chambers, W., et al. CDC4 mutations occur in a subset of colorectal cancers but are not predicted to cause loss of function and are not associated with chromosomal instability / *Cancer Res.* — 2005 Dec 15. — Vol. 65, No. 24. — P. 11361-6. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2565. — PMID: 16357143.
197. Keyes, J., Romania, T., Boaks, A., et al. New Genetically-encodable Tools to Probe the Nuanced Regulation of the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Pathway / *The FASEB Journal.* — 2022 May 1. — Vol. 36, No. S1. — DOI: 10.1096/fasebj.2022.36.s1.18010.
198. Khaitin, A. M., Guzenko, V. V., Bachurin, S. S., Demyanenko, S. V. c-Myc and FOXO3a—The Everlasting Decision Between Neural Regeneration and Degeneration / *International Journal of Molecular Sciences.* — 2024. — Vol. 25, No. 23. — Art. no. 12621. — DOI 10.3390/ijms252312621. — EDN: UPHPTK.
199. Kim, H., Choi, J., Yu, D. Y., Choi, H. J. Expression of Organic Anion Transporting Polypeptides in an H-Ras 12V Transgenic Mouse Model of Spontaneous Hepatocellular Carcinoma / *Yonsei Med J.* — 2021 Jul. — Vol. 62, No. 7. — P. 622-630. — DOI: 10.3349/ymj.2021.62.7.622. — PMID: 34164960. — PMCID: PMC8236347.
200. Kim, I. H., Nam, T. J. Fucoidan downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells / *Oncol Rep.* — 2018 Mar. — Vol. 39, No. 3. — P. 1516-1522. — DOI: 10.3892/or.2018.6193. — Epub 2018 Jan 4. — PMID: 29328495.
201. Kirsten, W. H., Schauf, V., McCoy, J. Properties of a murine sarcoma virus / *Bibl Haematol.* — 1970. — No. 36. — P. 246-9. — DOI: 10.1159/000391714. — PMID: 5538357.
202. Kiss, A. L., Botos, E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? / *J Cell Mol Med.* — 2009 Jul. — Vol. 13, No. 7. — P. 1228-37. — DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00754.x. — Epub 2009 Mar 27. — PMID: 19382909. — PMCID: PMC4496137.
203. Klomp, J. E., Klomp, J. A., Der, C. J. The ERK mitogen-activated protein kinase signaling network: the final frontier in RAS signal transduction / *Biochem Soc Trans.* — 2021 Feb 26. — Vol. 49, No. 1. — P. 253-267. — DOI: 10.1042/BST20200507. — PMID: 33544118.
204. Koppelhus, U., Awasthi, S. K., Zachar, V., et al. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates / *Antisense Nucleic Acid*

- Drug Dev. — 2002 Apr. — Vol. 12, No. 2. — P. 51-63. — DOI: 10.1089/108729002760070795. — PMID: 12074365.
205. Kousparou, C. A., Yiacoymi, E., Deonarain, M. P., Epenetos, A. A. Generation of a selectively cytotoxic fusion protein against p53 mutated cancers / *BMC Cancer*. — 2012 Aug 3. — Vol. 12. — Art. no. 338. — DOI: 10.1186/1471-2407-12-338. — PMID: 22862878. — PMCID: PMC3503689.
206. Krasinska, L., Fisher, D. Non-Cell Cycle Functions of the CDK Network in Ciliogenesis: Recycling the Cell Cycle Oscillator / *Bioessays*. — 2018 Jun. — Vol. 40, No. 6. — Art. no. e1800016. — DOI: 10.1002/bies.201800016. — Epub 2018 Apr 23. — PMID: 29682766.
207. Krasniqi, E., Goeman, F., Pulito, C., et al. Biomarkers of response and resistance to cdk4/6 inhibitors in breast cancer: hints from liquid biopsy and microRNA exploration / *Int J Mol Sci*. — 2022. — Vol. 23, No. 23. — Art. no. 14534. — DOI: 10.3390/ijms232314534.
208. Kristensen, M., Nielsen, H. M. Cell-penetrating peptides as tools to enhance non-injectable delivery of biopharmaceuticals / *Tissue Barriers*. — 2016 Apr 18. — Vol. 4, No. 2. — Art. no. e1178369. — DOI: 10.1080/21688370.2016.1178369. — PMID: 27358757. — PMCID: PMC4910831.
209. Kulhanek, K. R., Roose, J. P., Rubio, I. Regulation of the Small GTPase Ras and Its Relevance to Human Disease / *Methods Mol Biol*. — 2021. — Vol. 2262. — P. 19-43. — DOI: 10.1007/978-1-0716-1190-6_2. — PMID: 33977469.
210. Kume, H., Harigane, R., Rikimaru, M. Involvement of Lysophospholipids in Pulmonary Vascular Functions and Diseases / *Biomedicines*. — 2024 Jan 8. — Vol. 12, No. 1. — Art. no. 124. — DOI: 10.3390/biomedicines12010124. — PMID: 38255229. — PMCID: PMC10813361.
211. Lantvit, D. D., Unterberger, C. J., Lazar, M., et al. Mammary Tumors Growing in the Absence of Growth Hormone Are More Sensitive to Doxorubicin Than Wild-Type Tumors / *Endocrinology*. — 2021 Apr 1. — Vol. 162, No. 4. — Art. no. bqab013. — DOI: 10.1210/endocr/bqab013. — PMID: 33475144. — PMCID: PMC7881836.
212. Leake, R. The cell cycle and regulation of cancer cell growth / *Ann N Y Acad Sci*. — 1996. — Vol. 784. — P. 252–262. — DOI: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb16240.x.
213. Lee, C., Fernandez, K. J., Alexandrou, S., et al. Cyclin E2 Promotes Whole Genome Doubling in Breast Cancer / *Cancers (Basel)*. — 2020 Aug 13. — Vol. 12, No. 8. — Art. no. 2268. — DOI: 10.3390/cancers12082268. — PMID: 32823571. — PMCID: PMC7463708.

214. Lee, J. H., Sung, J. Y., Choi, E. K., et al. C/EBP β Is a Transcriptional Regulator of Wee1 at the G₂/M Phase of the Cell Cycle / *Cells*. — 2019 Feb 11. — Vol. 8, No. 2. — Art. no. 145. — DOI: 10.3390/cells8020145. — PMID: 30754676. — PMCID: PMC6407104.
215. Li, H., Tsui, T. Y., Ma, W. Intracellular Delivery of Molecular Cargo Using Cell-Penetrating Peptides and the Combination Strategies / *Int J Mol Sci*. — 2015 Aug 18. — Vol. 16, No. 8. — P. 19518-36. — DOI: 10.3390/ijms160819518. — PMID: 26295227. — PMCID: PMC4581311.
216. Li, X., Sun, K., Liao, X., et al. Colorectal carcinomas with mucinous differentiation are associated with high frequent mutation of KRAS or BRAF mutations, irrespective of quantity of mucinous component / *BMC Cancer*. — 2020 May 8. — Vol. 20, No. 1. — Art. no. 400. — DOI: 10.1186/s12885-020-06913-2. — PMID: 32384877. — PMCID: PMC7206795.
217. Li, J., Wu, W., Chen, J., et al. Development and Safety of Investigational and Approved Drugs Targeting the RAS Function Regulation in RAS Mutant Cancers / *Toxicological Sciences*. — 2024 Oct 8. — Art. no. kfae129. — DOI: 10.1093/toxsci/kfae129.
218. Lim, J. P., Gleeson, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps / *Immunol Cell Biol*. — 2011 Nov. — Vol. 89, No. 8. — P. 836-43. — DOI: 10.1038/icb.2011.20. — Epub 2011 Mar 22. — PMID: 21423264.
219. Linnane, E., Davey, P., Zhang, P., et al. Differential uptake, kinetics and mechanisms of intracellular trafficking of next-generation antisense oligonucleotides across human cancer cell lines / *Nucleic Acids Res*. — 2019 May 21. — Vol. 47, No. 9. — P. 4375-4392. — DOI: 10.1093/nar/gkz214. — PMID: 30927008. — PMCID: PMC6511877.
220. Liu, J., Jia, S., Yang, Y., et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling / *Biomed Pharmacother*. — 2023 Feb. — Vol. 158. — Art. no. 114118. — DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114118. — Epub 2022 Dec 15. — PMID: 36527845.
221. Liu, Q., Yuan, Y., Shang, X., Xin, L. Cyclin B2 impairs the p53 signaling in nasopharyngeal carcinoma / *BMC Cancer*. — 2024 Jan 2. — Vol. 24, No. 1. — Art. no. 25. — DOI: 10.1186/s12885-023-11768-4. — PMID: 38166895. — PMCID: PMC10763327.
222. Liu, Y., Chen, J., Li, X., et al. Natural products targeting RAS by multiple mechanisms and its therapeutic potential in cancer: An update since 2020 / *Pharmacol*

- Res. — 2025 Feb. — Vol. 212. — Art. no. 107577. — DOI: 10.1016/j.phrs.2025.107577. — Epub 2025 Jan 3. — PMID: 39756556.
223. Liu, Y., Deng, Y., Yang, C., Naranmandura, H. Double-Faced Immunological Effects of CDK4/6 Inhibitors on Cancer Treatment: Challenges and Perspectives / *Bioengineering*. — 2024 Oct 29. — Vol. 11, No. 11. — Art. no. 1084. — DOI: 10.3390/bioengineering11111084.
224. Löfgren, K., Wahlström, A., Lundberg, P., et al. Antiprion properties of prion protein-derived cell-penetrating peptides / *FASEB J*. — 2008 Jul. — Vol. 22, No. 7. — P. 2177-84. — DOI: 10.1096/fj.07-099549. — Epub 2008 Feb 22. — PMID: 18296502.
225. Lu, M., Wang, Y., Xu, F., et al. The prognostic of p27(kip1) in ovarian cancer: a meta-analysis / *Arch Gynecol Obstet*. — 2016 Jan. — Vol. 293, No. 1. — P. 169-176. — DOI: 10.1007/s00404-015-3817-8. — Epub 2015 Jul 22. — PMID: 26198169.
226. Lukasik, P., Załuski, M., Gutowska, I. Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development-Review / *Int J Mol Sci*. — 2021 Mar 13. — Vol. 22, No. 6. — Art. no. 2935. — DOI: 10.3390/ijms22062935. — PMID: 33805800. — PMCID: PMC7998717.
227. Lundberg, P., Kilk, K., Langel, U. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Delivery of Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomers / *CSH Protoc*. — 2008 Mar 1. — Vol. 2008. — Art. no. pdb.prot4889. — DOI: 10.1101/pdb.prot4889. — PMID: 21356781.
228. Luo, J., Florez, N., Donnelly, A., et al. Adagrasib Treatment After Sotorasib-Related Hepatotoxicity in Patients With KRASG12C-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: A Case Series and Literature Review / *JCO Precis Oncol*. — 2024 Apr. — Vol. 8. — Art. no. e2300644. — DOI: 10.1200/PO.23.00644. — Erratum in: *JCO Precis Oncol*. 2024 May;8:e2400255. — PMID: 38579193. — PMCID: PMC11018165.
229. Luo, L., Jan, L. Y., Jan, Y. N. Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling / *Curr Opin Neurobiol*. — 1997 Feb. — Vol. 7, No. 1. — P. 81-6. — DOI: 10.1016/s0959-4388(97)80124-9. — PMID: 9039798.
230. Lüttges, J., Schlehe, B., Menke, M. A., et al. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium / *Cancer*. — 1999 Apr 15. — Vol. 85, No. 8. — P. 1703-10. — PMID: 10223563.
231. Ma, H., Gao, Y., Wang, Y., et al. Regulatory Mechanisms of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plants: More than Sequential Phosphorylation / *Int J Mol Sci*. — 2022 Mar 25. — Vol. 23, No. 7. — Art. no. 3572. — DOI: 10.3390/ijms23073572. — PMID: 35408932. — PMCID: PMC8998894.

232. Ma, R., Li, S., Li, W., et al. KinasePhos 3.0: Redesign and Expansion of the Prediction on Kinase-specific Phosphorylation Sites / *Genomics Proteomics Bioinformatics*. — 2023 Feb. — Vol. 21, No. 1. — P. 228-241. — DOI: 10.1016/j.gpb.2022.06.004. — Epub 2022 Jul 1. — PMID: 35781048. — PMCID: PMC10373160.
233. Ma, T., Van Tine, B. A., Wei, Y., et al. Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription / *Genes Dev*. — 2000 Sep 15. — Vol. 14, No. 18. — P. 2298-313. — DOI: 10.1101/gad.829500. — PMID: 10995387. — PMCID: PMC316935.
234. Ma, Y., Ma, Y., Li, P., et al. Wnt5a alleviates the symptoms of PCOS by modulating PI3K/AKT/mTOR pathway-mediated autophagy in granulosa cells / *Cell Signal*. — 2025 Mar. — Vol. 127. — Art. no. 111575. — DOI: 10.1016/j.cellsig.2024.111575. — Epub 2024 Dec 20. — PMID: 39710088.
235. Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., et al. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc / *Mol Cancer*. — 2021 Jan 4. — Vol. 20, No. 1. — Art. no. 3. — DOI: 10.1186/s12943-020-01291-6. — PMID: 33397405. — PMCID: PMC7780693.
236. Mahran, R., Kapp, J. N., Valtonen, S., et al. Beyond KRAS(G12C): Biochemical and Computational Characterization of Sotorasib and Adagrasib Binding Specificity and the Critical Role of H95 and Y96 / *ACS Chem Biol*. — 2024 Oct 18. — Vol. 19, No. 10. — P. 2152-2164. — DOI: 10.1021/acscchembio.4c00315. — Epub 2024 Sep 16. — PMID: 39283696.
237. Maji, L., Teli, G., Raghavendra, N. M., et al. An updated literature on BRAF inhibitors (2018-2023) / *Mol Divers*. — 2024 Aug. — Vol. 28, No. 4. — P. 2689-2730. — DOI: 10.1007/s11030-023-10699-3. — Epub 2023 Jul 20. — PMID: 37470921.
238. Malapelle, U., Angerilli, V., Pepe, F., et al. The ideal reporting of RAS testing in colorectal adenocarcinoma: a pathologists' perspective / *Pathologica*. — 2023 Jun 14. — Vol. 115, No. 3. — P. 137-47. — DOI: 10.32074/1591-951X-895. — PMID: 37314870. — PMCID: PMC10462993.
239. Martínez-Méndez, D., Villarreal, C., Mendoza, L., Huerta, L. An Integrative Network Modeling Approach to T CD4 Cell Activation / *Front Physiol*. — 2020 Apr 23. — Vol. 11. — Art. no. 380. — DOI: 10.3389/fphys.2020.00380. — PMID: 32425809. — PMCID: PMC7212416.
240. Martin-Vega, A., Cobb, M. H. Navigating the ERK1/2 MAPK Cascade / *Biomolecules*. — 2023 Oct 20. — Vol. 13, No. 10. — Art. no. 1555. — DOI: 10.3390/biom13101555. — PMID: 37892237. — PMCID: PMC10605237.

241. Mathien, S., Tesnière, C., Meloche, S. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways by the Ubiquitin-Proteasome System and Its Pharmacological Potential / *Pharmacol Rev.* — 2021 Oct. — Vol. 73, No. 4. — P. 263-296. — DOI: 10.1124/pharmrev.120.000170. — PMID: 34732541.
242. Mathy, C. J. P., Mishra, P., Flynn, J. M., et al. A complete allosteric map of a GTPase switch in its native cellular network / *Cell Syst.* — 2023 Mar 15. — Vol. 14, No. 3. — P. 237-246.e7. — DOI: 10.1016/j.cels.2023.01.003. — Epub 2023 Feb 17. — PMID: 36801015. — PMCID: PMC10173951.
243. Mattox, T. E., Chen, X., Maxuitenko, Y. Y., et al. Exploiting RAS Nucleotide Cycling as a Strategy for Drugging RAS-Driven Cancers / *Int J Mol Sci.* — 2019 Dec 24. — Vol. 21, No. 1. — Art. no. 141. — DOI: 10.3390/ijms21010141. — PMID: 31878223. — PMCID: PMC6982188.
244. McCormick, F. A brief history of RAS and the RAS Initiative / *Adv Cancer Res.* — 2022. — Vol. 153. — P. 1-27. — DOI: 10.1016/bs.acr.2021.07.003. — Epub 2021 Sep 14. — PMID: 35101227.
245. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance / *Biochim Biophys Acta.* — 2007 Aug. — Vol. 1773, No. 8. — P. 1263-84. — DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.001. — Epub 2006 Oct 7. — PMID: 17126425. — PMCID: PMC2696318.
246. Melikov, K., Hara, A., Yamoah, K., et al. Efficient entry of cell-penetrating peptide nona-arginine into adherent cells involves a transient increase in intracellular calcium / *Biochem J.* — 2015 Oct 15. — Vol. 471, No. 2. — P. 221-30. — DOI: 10.1042/BJ20150272. — Epub 2015 Aug 13. — PMID: 26272944. — PMCID: PMC4613506.
247. Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., et al. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis / *Annu Rev Biochem.* — 2018 Jun 20. — Vol. 87. — P. 871-896. — DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012644. — Epub 2018 Apr 16. — PMID: 29661000. — PMCID: PMC6383209.
248. Meuwissen, R., Linn, S. C., van der Valk, M., et al. Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene / *Oncogene.* — 2001 Oct 4. — Vol. 20, No. 45. — P. 6551-8. — DOI: 10.1038/sj.onc.1204837. — PMID: 11641780.
249. Mima, J. Self-assemblies of Rab- and Arf-family small GTPases on lipid bilayers in membrane tethering / *Biophys Rev.* — 2021 Jul 12. — Vol. 13, No. 4. — P. 531-539.

— DOI: 10.1007/s12551-021-00819-4. — PMID: 34471437. — PMCID: PMC8355291.

250. Miyashita, H., Kato, S., Hong, D. S. KRAS G12C inhibitor combination therapies: current evidence and challenge / *Front Oncol.* — 2024 May 2. — Vol. 14. — Art. no. 1380584. — DOI: 10.3389/fonc.2024.1380584. — PMID: 38756650. — PMCID: PMC11097198.

251. Mo, H., Liu, X., Xue, Y., et al. S6K1 amplification confers innate resistance to CDK4/6 inhibitors through activating c-Myc pathway in patients with estrogen receptor-positive breast cancer / *Mol Cancer.* — 2022. — Vol. 21, No. 1. — Art. no. 171. — DOI: 10.1186/s12943-022-01642-5.

252. Mobasher, M., Vogt, M., Xerxa, E., Bajorath, J. Comprehensive Data-Driven Assessment of Non-Kinase Targets of Inhibitors of the Human Kinome / *Biomolecules.* — 2024 Feb 21. — Vol. 14, No. 3. — Art. no. 258. — DOI: 10.3390/biom14030258. — PMID: 38540679. — PMCID: PMC10967794.

253. Mor, A., Philips, M. R. Compartmentalized Ras/MAPK signaling / *Annu Rev Immunol.* — 2006. — Vol. 24. — P. 771-800. — DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090723. — PMID: 16551266.

254. Morán-Torres, R., Castillo González, D. A., Durán-Pastén, M. L., et al. Selective Moonlighting Cell-Penetrating Peptides / *Pharmaceutics.* — 2021 Jul 22. — Vol. 13, No. 8. — Art. no. 1119. — DOI: 10.3390/pharmaceutics13081119. — PMID: 34452080. — PMCID: PMC8400200.

255. More, H. T., Frezzo, J. A., Dai, J., et al. Gene delivery from supercharged coiled-coil protein and cationic lipid hybrid complex / *Biomaterials.* — 2014 Aug. — Vol. 35, No. 25. — P. 7188-93. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.005. — Epub 2014 May 27. — PMID: 24875765. — PMCID: PMC4099184.

256. Moreno-Vargas, L. M., Prada-Gracia, D. Cancer-Targeting Applications of Cell-Penetrating Peptides / *Int J Mol Sci.* — 2024 Dec 24. — Vol. 26, No. 1. — Art. no. 2. — DOI: 10.3390/ijms26010002. — PMID: 39795861. — PMCID: PMC11720565.

257. Moreno-Vargas, L. M., Prada-Gracia, D. Exploring the Chemical Features and Biomedical Relevance of Cell-Penetrating Peptides / *Int J Mol Sci.* — 2024 Dec 25. — Vol. 26, No. 1. — Art. no. 59. — DOI: 10.3390/ijms26010059. — PMID: 39795918. — PMCID: PMC11720145.

258. Morton, D., Seymour, M., Magill, L., et al. Preoperative Chemotherapy for Operable Colon Cancer: Mature Results of an International Randomized Controlled Trial / *J Clin Oncol.* — 2023 Mar 10. — Vol. 41, No. 8. — P. 1541-1552. — DOI:

10.1200/JCO.22.00046. — Epub 2023 Jan 19. — PMID: 36657089. — PMCID: PMC10022855.

259. Mudhakar, D., Harashima, H. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus / *AAPS J.* — 2009 Mar. — Vol. 11, No. 1. — P. 65-77. — DOI: 10.1208/s12248-009-9080-9. — Epub 2009 Feb 5. — PMID: 19194803. — PMCID: PMC2664881.

260. Müller, H., Walter, W., Hutter, S., et al. Aberrant somatic hypermutation of CCND1 generates non-coding drivers of mantle cell lymphomagenesis / *Cancer Gene Ther.* — 2022 May. — Vol. 29, No. 5. — P. 484-493. — DOI: 10.1038/s41417-022-00428-7. — Epub 2022 Feb 10. — PMID: 35145272. — PMCID: PMC9113931.

261. Murugan, A. K., Tsuchida, N., Grieco, M. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine / *Seminars in Cancer Biology.* — 2019. — Vol. 57. — DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.007.

262. Naguib, A., Wilson, C. H., Adams, D. J., Arends, M. J. Activation of K-RAS by co-mutation of codons 19 and 20 is transforming / *J Mol Signal.* — 2011 Mar 3. — Vol. 6. — Art. no. 2. — DOI: 10.1186/1750-2187-6-2. — PMID: 21371307. — PMCID: PMC3056876.

263. Nakase, I., Noguchi, K., Aoki, A., et al. Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery / *Sci Rep.* — 2017 May 16. — Vol. 7, No. 1. — Art. no. 1991. — DOI: 10.1038/s41598-017-02014-6. — PMID: 28512335. — PMCID: PMC5434003.

264. Nakase, I., Osaki, K., Tanaka, G., et al. Molecular interplays involved in the cellular uptake of octaarginine on cell surfaces and the importance of syndecan-4 cytoplasmic V domain for the activation of protein kinase $C\alpha$ / *Biochem Biophys Res Commun.* — 2014 Apr 18. — Vol. 446, No. 4. — P. 857-62. — DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.018. — Epub 2014 Mar 12. — PMID: 24632200.

265. Nakayama, K., Rahman, M. T., Rahman, M., et al. CCNE1 amplification is associated with aggressive potential in endometrioid endometrial carcinomas / *Int J Oncol.* — 2016 Feb. — Vol. 48, No. 2. — P. 506-16. — DOI: 10.3892/ijo.2015.3268. — Epub 2015 Nov 26. — PMID: 26647729. — PMCID: PMC4725452.

266. Nasser, A. M., Melamed, L., Wetzel, E. A., et al. CDKN2A/B Homozygous Deletion Sensitizes IDH-Mutant Glioma to CDK4/6 Inhibition / *Clin Cancer Res.* — 2024 Jul 15. — Vol. 30, No. 14. — P. 2996-3005. — DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0562. — PMID: 38718141. — PMCID: PMC11250907.

267. Nors, J., Iversen, L. H., Erichsen, R., et al. Incidence of Recurrence and Time to Recurrence in Stage I to III Colorectal Cancer: A Nationwide Danish Cohort Study /

JAMA Oncol. — 2024 Jan 1. — Vol. 10, No. 1. — P. 54-62. — DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.5098.

268. Nussinov, R., Zhang, W., Liu, Y., Jang, H. Mitogen signaling strength and duration can control cell cycle decisions / *Sci Adv.* — 2024 Jul 5. — Vol. 10, No. 27. — Art. no. eadm9211. — DOI: 10.1126/sciadv.adm9211. — Epub 2024 Jul 5. — PMID: 38968359. — PMCID: PMC11809619.

269. Oba, M., Nakajima, S., Misao, K., et al. Effect of helicity and hydrophobicity on cell-penetrating ability of arginine-rich peptides / *Bioorg Med Chem.* — 2023 Aug 15. — Vol. 91. — Art. no. 117409. — DOI: 10.1016/j.bmc.2023.117409. — Epub 2023 Jul 5. — PMID: 37441862.

270. Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., et al. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically / *Biochim Biophys Acta.* — 1998 Nov 11. — Vol. 1414, No. 1-2. — P. 127-39. — DOI: 10.1016/s0005-2736(98)00161-8. — PMID: 9804921.

271. O'Leary, B., Finn, R. S., Turner, N. C. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors / *Nat Rev Clin Oncol.* — 2016. — Vol. 13. — P. 417-430. — DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.26.

272. Olson, M. F., Marais, R. Ras protein signalling / *Semin Immunol.* — 2000 Feb. — Vol. 12, No. 1. — P. 63-73. — DOI: 10.1006/smim.2000.0208. — PMID: 10723799.

273. Österlund, N., Wärmländer, S. K. T. S., Gräslund, A. Cell-Penetrating Peptides with Unexpected Anti-Amyloid Properties / *Pharmaceutics.* — 2022 Apr 9. — Vol. 14, No. 4. — Art. no. 823. — DOI: 10.3390/pharmaceutics14040823. — PMID: 35456657. — PMCID: PMC9027922.

274. Otto, T., Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy / *Nat Rev Cancer.* — 2017 Jan 27. — Vol. 17, No. 2. — P. 93-115. — DOI: 10.1038/nrc.2016.138. — PMID: 28127048. — PMCID: PMC5345933.

275. Ouyang, J., Sheng, Y., Wang, W. Recent Advances of Studies on Cell-Penetrating Peptides Based on Molecular Dynamics Simulations / *Cells.* — 2022 Dec 12. — Vol. 11, No. 24. — Art. no. 4016. — DOI: 10.3390/cells11244016. — PMID: 36552778. — PMCID: PMC9776715.

276. Ozturk, E., Yakan, B., Hamurcu, Z. Flavopiridol Suppresses Cell Proliferation and Metastasis and Induces Endoplasmic Reticulum Stress of Triple Negative Breast Cancer Cells / *Res. Sq.* — 2024. — Art. no. rs.3.rs-4548167. — DOI: 10.21203/rs.3.rs-4548167/v1.

277. Palmer, N., Talib, S. Z. A., Goh, C. M. F., et al. Identification PMS1 and PMS2 as potential meiotic substrates of CDK2 activity / *PLoS One*. — 2023 Mar 23. — Vol. 18, No. 3. — Art. no. e0283590. — DOI: 10.1371/journal.pone.0283590. — PMID: 36952545. — PMCID: PMC10035876.
278. Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., Weinberg, R. A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene / *Nature*. — 1982 Jun 10. — Vol. 297, No. 5866. — P. 474-8. — DOI: 10.1038/297474a0. — PMID: 6283357.
279. Park, Y. Y., Ahn, J. H., Cho, M. G., Lee, J. H. ATP depletion during mitotic arrest induces mitotic slippage and APC/CCdh1-dependent cyclin B1 degradation / *Exp Mol Med*. — 2018 Apr 27. — Vol. 50, No. 4. — P. 1-14. — DOI: 10.1038/s12276-018-0069-2. — PMID: 29700288. — PMCID: PMC5938023.
280. Parker, J. A., Mattos, C. The K-Ras, N-Ras, and H-Ras Isoforms: Unique Conformational Preferences and Implications for Targeting Oncogenic Mutants / *Cold Spring Harb Perspect Med*. — 2018 Aug 1. — Vol. 8, No. 8. — Art. no. a031427. — DOI: 10.1101/cshperspect.a031427. — PMID: 29038336. — PMCID: PMC6071550.
281. Parker, J. A., Mattos, C. The Ras-Membrane Interface: Isoform-specific Differences in The Catalytic Domain / *Mol Cancer Res*. — 2015 Apr. — Vol. 13, No. 4. — P. 595-603. — DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0535. — Epub 2015 Jan 7. — PMID: 25566993.
282. Perurena, N., Situ, L., Cichowski, K. Combinatorial strategies to target RAS-driven cancers / *Nat Rev Cancer*. — 2024 May. — Vol. 24, No. 5. — P. 316-337. — DOI: 10.1038/s41568-024-00679-6. — Epub 2024 Apr 16. — PMID: 38627557.
283. Petrelli, F., Ghidini, A., Pedersini, R., et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials / *Breast Cancer Res Treat*. — 2019. — Vol. 174. — P. 597–604. — DOI: 10.1007/s10549-019-05133-y.
284. Plénat, T., Deshayes, S., Boichot, S., et al. Interaction of primary amphipathic cell-penetrating peptides with phospholipid-supported monolayers / *Langmuir*. — 2004 Oct 12. — Vol. 20, No. 21. — P. 9255-61. — DOI: 10.1021/la048622b. — PMID: 15461515.
285. Poratti, M., Marzaro, G. Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib / *Eur. J. Med. Chem*. — 2019. — Vol. 172. — P. 143–153.
286. Porosk, L., Härk, H. H., Bicev, R. N., et al. Aggregation Limiting Cell-Penetrating Peptides Derived from Protein Signal Sequences / *Int J Mol Sci*. — 2023

Feb 21. — Vol. 24, No. 5. — Art. no. 4277. — DOI: 10.3390/ijms24054277. — PMID: 36901707. — PMCID: PMC10002422.

287. Prajapati, V., Singh, A. K., Kumar, A., et al. Structural insights, regulation, and recent advances of RAS inhibitors in the MAPK signaling cascade: a medicinal chemistry perspective / *RSC Med Chem.* — 2025 Mar 5. — DOI: 10.1039/d4md00923a. — Epub ahead of print. — PMID: 40052089. — PMCID: PMC11880839.

288. Prevo, R., Pirovano, G., Puliyadi, R., et al. CDK1 inhibition sensitizes normal cells to DNA damage in a cell cycle dependent manner / *Cell Cycle.* — 2018. — Vol. 17, No. 12. — P. 1513-1523. — DOI: 10.1080/15384101.2018.1491236. — Epub 2018 Jul 25. — PMID: 30045664. — PMCID: PMC6132956.

289. Prior, I. A., Hood, F. E., Hartley, J. L. The Frequency of Ras Mutations in Cancer / *Cancer Res.* — 2020 Jul 15. — Vol. 80, No. 14. — P. 2969-2974. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3682. — Epub 2020 Mar 24. — PMID: 32209560. — PMCID: PMC7367715.

290. Qian, Z., Martyna, A., Hard, R. L., et al. Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides / *Biochemistry.* — 2016 May 10. — Vol. 55, No. 18. — P. 2601-12. — DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00226. — Epub 2016 Apr 28. — PMID: 27089101. — PMCID: PMC8562596.

291. Qiu, T., Kong, Y., Wei, G., et al. CCDC6-RET fusion protein regulates Ras/MAPK signaling through the fusion- GRB2-SHC1 signal niche / *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2024 Jun 4. — Vol. 121, No. 23. — Art. no. e2322359121. — DOI: 10.1073/pnas.2322359121. — Epub 2024 May 28. — PMID: 38805286. — PMCID: PMC11161787.

292. Raheem, F., Ofori, H., Simpson, L., Shah, V. Abemaciclib: The first FDA-approved CDK4/6 inhibitor for the adjuvant treatment of HR+ HER2- early breast cancer / *Ann. Pharmacother.* — 2022. — Vol. 56. — P. 1258–1266. — DOI: 10.1177/10600280211073322.

293. Rajalingam, K., Rudel, T. Ras-Raf signaling needs prohibitin / *Cell Cycle.* — 2005 Nov. — Vol. 4, No. 11. — P. 1503-5. — DOI: 10.4161/cc.4.11.2142. — Epub 2005 Nov 1. — PMID: 16294014.

294. Rampioni Vinciguerra, G. L., Sonogo, M., Segatto, I., et al. CDK4/6 Inhibitors in Combination Therapies: Better in Company Than Alone: A Mini Review / *Front Oncol.* — 2022 May 27. — Vol. 12. — Art. no. 891580. — DOI: 10.3389/fonc.2022.891580. — PMID: 35712501. — PMCID: PMC9197541.

295. Rana, S., Mallareddy, J. R., Singh, S., et al. Inhibitors, PROTACs and Molecular Glues as Diverse Therapeutic Modalities to Target Cyclin-Dependent Kinase / *Cancers (Basel)*. — 2021 Nov 2. — Vol. 13, No. 21. — Art. no. 5506. — DOI: 10.3390/cancers13215506. — PMID: 34771669. — PMCID: PMC8583118.
296. Ray, D., Terao, Y., Nimbalkar, D., et al. Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice / *Cancer Res*. — 2007 Jul 15. — Vol. 67, No. 14. — P. 6605-11. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4815. — PMID: 17638870.
297. Reiner, D. J., Lundquist, E. A. Small GTPases / *WormBook*. — 2018 Aug 16. — Vol. 2018. — P. 1-65. — DOI: 10.1895/wormbook.1.67.2. — PMID: 27218782. — PMCID: PMC6369420.
298. Reissmann, S., Filatova, M. P. New generation of cell-penetrating peptides: Functionality and potential clinical application / *J Pept Sci*. — 2021 May. — Vol. 27, No. 5. — Art. no. e3300. — DOI: 10.1002/psc.3300. — Epub 2021 Feb 21. — PMID: 33615648.
299. Reissmann, S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides / *J Pept Sci*. — 2014 Oct. — Vol. 20, No. 10. — P. 760-84. — DOI: 10.1002/psc.2672. — Epub 2014 Aug 11. — PMID: 25112216.
300. Rieser, C. J., Jones, H., Hall, L. B., et al. Definition and Prediction of Early Recurrence and Mortality Following Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Colorectal Peritoneal Metastases: Towards Predicting Oncologic Futility Preoperatively / *Ann Surg Oncol*. — 2021. — Vol. 28. — P. 9116–9125. — DOI: 10.1245/s10434-021-10289-3.
301. Rio-Vilariño, A., Del Puerto-Nevado, L., García-Foncillas, J., Cebrián, A. Ras Family of Small GTPases in CRC: New Perspectives for Overcoming Drug Resistance / *Cancers (Basel)*. — 2021 Jul 26. — Vol. 13, No. 15. — Art. no. 3757. — DOI: 10.3390/cancers13153757. — PMID: 34359657. — PMCID: PMC8345156.
302. Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., Valencia, A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids / *J Cell Biol*. — 2012 Jan 23. — Vol. 196, No. 2. — P. 189-201. — DOI: 10.1083/jcb.201103008. — Erratum in: *J Cell Biol*. 2012 Feb 20;196(4):545. — PMID: 22270915. — PMCID: PMC3265948.
303. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s / *Nature*. — 1993. — Vol. 362. — P. 801-808.
304. Rubin, S. M., Gall, A. L., Zheng, N., Pavletich, N. P. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F

- release / *Cell*. — 2005 Dec 16. — Vol. 123, No. 6. — P. 1093-106. — DOI: 10.1016/j.cell.2005.09.044. — PMID: 16360038.
305. Rudrabhatla, P., Rajasekharan, R. Developmentally regulated dual-specificity kinase from peanut that is induced by abiotic stresses / *Plant Physiol*. — 2002 Sep. — Vol. 130, No. 1. — P. 380-90. — DOI: 10.1104/pp.005173. — PMID: 12226517. — PMCID: PMC166570.
306. Rudrabhatla, P., Rajasekharan, R. Mutational analysis of stress-responsive peanut dual specificity protein kinase. Identification of tyrosine residues involved in regulation of protein kinase activity / *J Biol Chem*. — 2003 May 9. — Vol. 278, No. 19. — P. 17328-35. — DOI: 10.1074/jbc.M300024200. — Epub 2003 Mar 5. — PMID: 12624102.
307. Ruseska, I., Zimmer, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides / *Beilstein J Nanotechnol*. — 2020 Jan 9. — Vol. 11. — P. 101-123. — DOI: 10.3762/bjnano.11.10. — PMID: 31976201. — PMCID: PMC6964662.
308. Russo, L., Muturi, H. T., Ghadieh, H. E., et al. Liver-specific rescuing of CEACAM1 reverses endothelial and cardiovascular abnormalities in male mice with null deletion of Ceacam1 gene / *Mol Metab*. — 2018 Mar. — Vol. 9. — P. 98-113. — DOI: 10.1016/j.molmet.2018.01.009. — Epub 2018 Jan 31. — PMID: 29396368. — PMCID: PMC5870095.
309. Ryu, Y., Kim, E. H., Jang, H., et al. Targeted Delivery of miR-34a via Anti-CD47 Antibody Conjugates for Enhanced Cancer Immunotherapy in Triple Negative Breast Cancer / *Small*. — 2025 Sep. — Vol. 21, No. 36. — Art. no. e04468. — DOI: 10.1002/sml.202504468. — Epub 2025 Jul 22. — PMID: 40692392. — PMCID: PMC12423919.
310. Sadeghi Shaker, M., Rokni, M., Mahmoudi, M., Farhadi, E. Ras family signaling pathway in immunopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases / *Front Immunol*. — 2023 May 15. — Vol. 14. — Art. no. 1151246. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1151246. — PMID: 37256120. — PMCID: PMC10225558.
311. Sahni, A., Qian, Z., Pei, D. Cell-Penetrating Peptides Escape the Endosome by Inducing Vesicle Budding and Collapse / *ACS Chem Biol*. — 2020 Sep 18. — Vol. 15, No. 9. — P. 2485-2492. — DOI: 10.1021/acscchembio.0c00478. — Epub 2020 Aug 26. — PMID: 32786250. — PMCID: PMC7512842.
312. Salles, D., Malinverni, A. C. M., Stávale, J. N., et al. The involvement of the MAPK pathway in pilocytic astrocytomas / *Pathology - Research and Practice*. — 2022. — Vol. 232. — Art. no. 153821. — DOI: 10.1016/j.prp.2022.153821. — EDN: IHJMZF.

313. Salzano, G., Torchilin, V. P. Intracellular Delivery of Nanoparticles with Cell Penetrating Peptides / *Methods Mol Biol.* — 2015. — Vol. 1324. — P. 357-68. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2806-4_24. — PMID: 26202282.
314. Samson, S. C., Khan, A. M., Mendoza, M. C. ERK Signaling for Cell Migration and Invasion / *Frontiers in Molecular Biosciences.* — 2022 Oct 3. — Vol. 9. — Art. no. 998475. — DOI: 10.3389/fmolb.2022.998475.
315. Sánchez-Hidalgo, J. M., Rodríguez-Ortiz, L., Arjona-Sánchez, Á., et al. Colorectal peritoneal metastases: Optimal management review / *World J Gastroenterol.* — 2019. — Vol. 25, No. 27. — P. 3484-3502. — DOI: 10.3748/wjg.v25.i27.3484. — PMID: 31367152.
316. Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., et al. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes / *Nature.* — 1982 Jul 22. — Vol. 298, No. 5872. — P. 343-7. — DOI: 10.1038/298343a0. — PMID: 6283384.
317. Scardaci, R., Berlinska, E., Scaparone, P., et al. Novel RAF-Directed Approaches to Overcome Current Clinical Limits and Block the RAS/RAF Node / *Molecular Oncology.* — 2024 Feb 16. — DOI: 10.1002/1878-0261.13605.
318. Scheffzek, K., Shivalingaiah, G. Ras-Specific GTPase-Activating Proteins-Structures, Mechanisms, and Interactions / *Cold Spring Harb Perspect Med.* — 2019 Mar 1. — Vol. 9, No. 3. — Art. no. a031500. — DOI: 10.1101/cshperspect.a031500. — PMID: 30104198. — PMCID: PMC6396337.
319. Schirripa, A., Sexl, V., Kollmann, K. Cyclin-dependent kinase inhibitors in malignant hematopoiesis / *Front Oncol.* — 2022 Aug 11. — Vol. 12. — Art. no. 916682. — DOI: 10.3389/fonc.2022.916682. — PMID: 36033505. — PMCID: PMC9403899.
320. Schmidt, S., Wallbrecher, R., van Kuppevelt, T. H., Brock, R. Methods to Study the Role of the Glycocalyx in the Uptake of Cell-Penetrating Peptides / *Methods Mol Biol.* — 2015. — Vol. 1324. — P. 123-31. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2806-4_8. — Erratum in: *Methods Mol Biol.* 2015;1324:E1. — PMID: 26202266.
321. Schweins, T., Wittinghofer, A. GTP-binding proteins. Structures, interactions and relationships / *Curr Biol.* — 1994 Jun 1. — Vol. 4, No. 6. — P. 547-50. — DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00122-6. — PMID: 7922378.
322. Scott, A. J., Lieu, C. H., Messersmith, W. A. Therapeutic Approaches to RAS Mutation / *Cancer J.* — 2016 May-Jun. — Vol. 22, No. 3. — P. 165-74. — DOI: 10.1097/PPO.0000000000000187. — PMID: 27341593. — PMCID: PMC4959441.

323. Seberg, H. E., Van Otterloo, E., Cornell, R. A. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma / *Pigment Cell Melanoma Res.* — 2017 Sep. — Vol. 30, No. 5. — P. 454-466. — DOI: 10.1111/pcmr.12611. — PMID: 28649789. — PMCID: PMC5939569.
324. Segawa, K., Tamura, N., Mima, J. Homotypic and heterotypic trans-assembly of human Rab-family small GTPases in reconstituted membrane tethering / *J Biol Chem.* — 2019 May 10. — Vol. 294, No. 19. — P. 7722-7739. — DOI: 10.1074/jbc.RA119.007947. — Epub 2019 Mar 25. — PMID: 30910814. — PMCID: PMC6514636.
325. Seres, M., Spacayova, K., Sulova, Z., et al. Dynamic Multilevel Regulation of EGFR, KRAS, and MYC Oncogenes: Driving Cancer Cell Proliferation Through (Epi)Genetic and Post-Transcriptional/Translational Pathways / *Cancers (Basel).* — 2025 Jan 14. — Vol. 17, No. 2. — Art. no. 248. — DOI: 10.3390/cancers17020248. — PMID: 39858030. — PMCID: PMC11763799.
326. Sharma, S. S., Pledger, W. J. The non-canonical functions of p27(Kip1) in normal and tumor biology / *Cell Cycle.* — 2016 May 2. — Vol. 15, No. 9. — P. 1189-201. — DOI: 10.1080/15384101.2016.1157238. — Epub 2016 Apr 15. — PMID: 27082696. — PMCID: PMC4889241.
327. Shekhar, S. Terminating Oncogenic Signaling: Rational Design of a Molecular Inhibitor Distorting and Inactivating GTP Bound to Oncogenic Mutated RAS Proteins [Preprint] / Cambridge Open Engage. — 2024 Dec 9. — DOI: 10.33774/coe-2024-
vd9w7.
328. Shen, M., Ma, Z., Zhu, J., et al. CDK4/6 Inhibitors in HR-Positive Breast Cancer Immunotherapy / *Bioorganic Chemistry.* — 2024 Dec 25. — Vol. 154. — Art. no. 108095. — DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.108095.
329. Shima, F., Yoshikawa, Y., Makino, Y., et al. Small-Molecule RAS/RAF Binding Inhibitors Allosterically Disrupt RAF Conformation and Exert Efficacy Against a Broad Spectrum of RAS-Driven Cancers [Preprint] / Research Square. — 2024 Jan 23. — Art. no. rs.3.rs-3872110. — DOI: 10.21203/rs.3.rs-3872110/v1.
330. Shin, M. C., Zhang, J., David, A. E., et al. Chemically and biologically synthesized CPP-modified gelonin for enhanced anti-tumor activity / *J Control Release.* — 2013 Nov 28. — Vol. 172, No. 1. — P. 169-178. — DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.08.016. — Epub 2013 Aug 23. — PMID: 23973813. — PMCID: PMC3849409.
331. Shou, J. Z., Hu, N., Takikita, M., et al. Overexpression of CDC25B and LAMC2 mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinomas and premalignant lesions in

- subjects from a high-risk population in China / *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* — 2008 Jun. — Vol. 17, No. 6. — P. 1424-35. — DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0666. — PMID: 18559558. — PMCID: PMC2729558.
332. Singh, K., Pruski, M., Bland, R., et al. Kras mutation rate precisely orchestrates ductal derived pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer / *Lab Invest.* — 2021 Feb. — Vol. 101, No. 2. — P. 177-192. — DOI: 10.1038/s41374-020-00490-5. — Epub 2020 Oct 2. — Erratum in: *Lab Invest.* 2021 Sep;101(9):1304. — PMID: 33009500. — PMCID: PMC8172380.
333. Singhal, A., Li, B. T., O'Reilly, E. M. Targeting KRAS in cancer / *Nat Med.* — 2024 Apr. — Vol. 30, No. 4. — P. 969-983. — DOI: 10.1038/s41591-024-02903-0. — Epub 2024 Apr 18. — PMID: 38637634. — PMCID: PMC11845254.
334. Sokhi, S., Lewis, C. W., Bukhari, A. B., et al. Myt1 overexpression mediates resistance to cell cycle and DNA damage checkpoint kinase inhibitors / *Front Cell Dev Biol.* — 2023 Nov 2. — Vol. 11. — Art. no. 1270542. — DOI: 10.3389/fcell.2023.1270542. — PMID: 38020882. — PMCID: PMC10652759.
335. Song, G., Liu, J., Tang, X., et al. Cell cycle checkpoint revolution: targeted therapies in the fight against malignant tumors / *Front Pharmacol.* — 2024 Oct 11. — Vol. 15. — Art. no. 1459057. — DOI: 10.3389/fphar.2024.1459057. — PMID: 39464635. — PMCID: PMC11505109.
336. Song, H. J., Jeon, I. S., Kim, S. R., et al. PKC- β modulates Ca²⁺ mobilization through Stim1 phosphorylation / *Genes Genomics.* — 2022 May. — Vol. 44, No. 5. — P. 571-582. — DOI: 10.1007/s13258-022-01230-3. — Epub 2022 Mar 7. — PMID: 35254656. — PMCID: PMC9042968.
337. Song, Y., Bi, Z., Liu, Y., et al. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials / *Genes Dis.* — 2022 May 20. — Vol. 10, No. 1. — P. 76-88. — DOI: 10.1016/j.gendis.2022.05.006. — PMID: 37013062. — PMCID: PMC10066287.
338. Sonke, G. S., et al. Primary outcome analysis of the phase 3 SONIA trial (BOOG-2017-03) on selecting the optimal position of cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors in patients with hormone receptor positive, HER2-negative advanced breast cancer [Abstract LBA1000] / 2023 ASCO Annual Meeting.
339. Steelman, L. S., Franklin, R. A., Abrams, S. L., et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy / *Leukemia.* — 2011 Jul. — Vol. 25, No. 7. — P. 1080-94. — DOI: 10.1038/leu.2011.66. — Epub 2011 Apr 15. — PMID: 21494257.

340. Stemkowski, P. L., Tse, F. W., Peuckmann, V., et al. ATP-inhibition of M current in frog sympathetic neurons involves phospholipase C but not Ins P(3), Ca(2+), PKC, or Ras / *J Neurophysiol.* — 2002 Jul. — Vol. 88, No. 1. — P. 277-88. — DOI: 10.1152/jn.2002.88.1.277. — PMID: 12091553.
341. Su, W., Mukherjee, R., Yaeger, R., et al. ARAF protein kinase activates RAS by antagonizing its binding to RASGAP NF1 / *Mol Cell.* — 2022 Jul 7. — Vol. 82, No. 13. — P. 2443-2457.e7. — DOI: 10.1016/j.molcel.2022.04.034. — Epub 2022 May 24. — PMID: 35613620. — PMCID: PMC9271631.
342. Suetsugu, T., Tsuruzono, K., Hatanaka, M., et al. Sotorasib Is Not Effective in a KRAS-Mutated Patient With Brain Metastases From Lung Adenocarcinoma due to Multiple Gene Co-Mutations / *Respirol Case Rep.* — 2025 May 6. — Vol. 13, No. 5. — Art. no. e70206. — DOI: 10.1002/rcr2.70206. — PMID: 40337291. — PMCID: PMC12055517.
343. Sun, J., Liang, S., Liu, X., et al. Insights into the selectivity of a brain-penetrant CDK4/6 vs CDK1/2 inhibitor for glioblastoma used in multiple replica molecular dynamics simulations / *J Biomol Struct Dyn.* — 2025 Mar. — Vol. 43, No. 5. — P. 2223-2242. — DOI: 10.1080/07391102.2023.2294175. — Epub 2023 Dec 19. — PMID: 38112295.
344. Sun, J. M., Shen, L., Shah, M. A., et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study / *Lancet.* — 2021 Aug 28. — Vol. 398, No. 10302. — P. 759-771. — DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01234-4. — Erratum in: *Lancet.* 2021 Nov 20;398(10314):1874. — PMID: 34454674.
345. Sun, M., Cheng, Q., Shi, X., et al. Post-marketing safety concerns with palbociclib: A disproportionality analysis of the FDA adverse event reporting system / *Expert Opin. Drug Saf.* — 2024. — Vol. 23. — P. 637-648. — DOI: 10.1080/14740338.2024.2338247.
346. Suski, J. M., Braun, M., Strmiska, V., Sicinski, P. Targeting cell-cycle machinery in cancer / *Cancer Cell.* — 2021 Jun 14. — Vol. 39, No. 6. — P. 759-778. — DOI: 10.1016/j.ccell.2021.03.010. — Epub 2021 Apr 22. — PMID: 33891890. — PMCID: PMC8206013.
347. Sydorenko, V., Shuba, Y., Thebault, S., et al. Receptor-coupled, DAG-gated Ca²⁺-permeable cationic channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells / *J Physiol.* — 2003 May 1. — Vol. 548, Pt. 3. — P. 823-36. — DOI: 10.1113/jphysiol.2002.036772. — PMID: 12724346. — PMCID: PMC2342876.

348. Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. Small GTP-binding proteins / *Physiol Rev.* — 2001 Jan. — Vol. 81, No. 1. — P. 153-208. — DOI: 10.1152/physrev.2001.81.1.153. — PMID: 11152757.
349. Takeshima, K., Chikushi, A., Lee, K. K., et al. Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes / *J Biol Chem.* — 2003 Jan 10. — Vol. 278, No. 2. — P. 1310-5. — DOI: 10.1074/jbc.M208762200. — Epub 2002 Nov 1. — PMID: 12417587.
350. Tarnawski, A. S., Ahluwalia, A. The Critical Role of Growth Factors in Gastric Ulcer Healing: The Cellular and Molecular Mechanisms and Potential Clinical Implications / *Cells.* — 2021 Aug 2. — Vol. 10, No. 8. — Art. no. 1964. — DOI: 10.3390/cells10081964. — PMID: 34440733. — PMCID: PMC8392882.
351. Tomas, A., Futter, C. E., Eden, E. R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer / *Trends Cell Biol.* — 2014 Jan. — Vol. 24, No. 1. — P. 26-34. — DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.002. — Epub 2013 Nov 29. — PMID: 24295852. — PMCID: PMC3884125.
352. Toncheva, D., Zaharieva, B. Coexistence of copy number changes of different genes (INK4A, erbB-1, erbB-2, CMYC, CCND1 and ZNF217) in urothelial tumors / *Tumour Biol.* — 2005 Mar-Apr. — Vol. 26, No. 2. — P. 88-93. — DOI: 10.1159/000085815. — Epub 2005 May 13. — PMID: 15897688.
353. Topham, M. K., Prescott, S. M. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism / *J Cell Biol.* — 2001 Mar 19. — Vol. 152, No. 6. — P. 1135-43. — DOI: 10.1083/jcb.152.6.1135. — PMID: 11257115. — PMCID: PMC2199204.
354. Torchilin, V. P. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery / *Biopolymers.* — 2008. — Vol. 90, No. 5. — P. 604-10. — DOI: 10.1002/bip.20989. — PMID: 18381624.
355. Tóth, K., Gaál, Z. Impact of Tyrosine Kinase Inhibitors on the Expression Pattern of Epigenetic Regulators / *Cancers (Basel).* — 2025 Apr 10. — Vol. 17, No. 8. — Art. no. 1282. — DOI: 10.3390/cancers17081282. — PMID: 40282457. — PMCID: PMC12025482.
356. Tran, D. B., Christov, K., Mander, S., et al. Intracellular redistribution of cell-penetrating peptide p28: A mechanism for enhanced anti-cancer activity / *J Control Release.* — 2025 Mar 24. — Vol. 382. — P. 113660. — DOI: 10.1016/j.jconrel.2025.113660. — Epub ahead of print. — PMID: 40139396.
357. Tran, T. H., Chan, A. H., Young, L. C., et al. KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF

- activation / *Nat Commun.* — 2021 Feb 19. — Vol. 12, No. 1. — Art. no. 1176. — DOI: 10.1038/s41467-021-21422-x. — PMID: 33608534. — PMCID: PMC7895934.
358. Trehin, R., Krauss, U., Beck-Sickinger, A. G., et al. Cellular uptake but low permeation of human calcitonin-derived cell penetrating peptides and Tat(47-57) through well-differentiated epithelial models / *Pharmacology Research.* — 2004. — Vol. 21, No. 7. — P. 1248-1256.
359. Tripathi, K., Garg, M. Mechanistic regulation of epithelial-to-mesenchymal transition through RAS signaling pathway and therapeutic implications in human cancer / *J Cell Commun Signal.* — 2018 Sep. — Vol. 12, No. 3. — P. 513-527. — DOI: 10.1007/s12079-017-0441-3. — Epub 2018 Jan 12. — PMID: 29330773. — PMCID: PMC6039341.
360. Uprety, D., Adjei, A. A. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target / *Cancer Treat Rev.* — 2020 Sep. — Vol. 89. — Art. no. 102070. — DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102070. — Epub 2020 Jul 15. — PMID: 32711246.
361. Vallée, B., Doudeau, M., Godin, F., et al. Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways / *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, No. 10. — Art. no. e47283. — DOI: 10.1371/journal.pone.0047283. — Epub 2012 Oct 17. — PMID: 23082153. — PMCID: PMC3474823.
362. Van Cutsem, E., Bang, Y. J., Mansoor, W., et al. A randomized, open-label study of the efficacy and safety of AZD4547 monotherapy versus paclitaxel for the treatment of advanced gastric adenocarcinoma with FGFR2 polysomy or gene amplification / *Ann Oncol.* — 2017 Jun 1. — Vol. 28, No. 6. — P. 1316-1324. — DOI: 10.1093/annonc/mdx107. — PMID: 29177434.
363. Vasconcelos, L., Pärn, K., Langel, U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides / *Ther Deliv.* — 2013 May. — Vol. 4, No. 5. — P. 573-91. — DOI: 10.4155/tde.13.22. — PMID: 23647276.
364. Vasta, J. D., Michaud, A., Zimprich, C., et al. Protomer Selectivity of Type II RAF Inhibitors within the RAS/RAF Complex / *Cell Chemical Biology.* — 2023 Aug 1. — DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.07.019.
365. Veldhoen, S., Laufer, S. D., Restle, T. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery / *Int J Mol Sci.* — 2008 Jun. — Vol. 9, No. 7. — P. 1276-1320. — DOI: 10.3390/ijms9071276. — Epub 2008 Jul 16. — PMID: 19325804. — PMCID: PMC2635728.
366. Veldhoen, S., Laufer, S. D., Trampe, A., Restle, T. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect / *Nucleic Acids Res.* — 2006. — Vol. 34, No.

22. — P. 6561-73. — DOI: 10.1093/nar/gkl941. — Epub 2006 Nov 28. — PMID: 17135188. — PMCID: PMC1747183.
367. Volmar, A. Y., Guterres, H., Zhou, H., et al. Mechanisms of isoform-specific residue influence on GTP-bound HRas, KRas, and NRas / *Biophys J*. — 2022 Oct 4. — Vol. 121, No. 19. — P. 3616-3629. — DOI: 10.1016/j.bpj.2022.07.005. — Epub 2022 Jul 6. — PMID: 35794829. — PMCID: PMC9617160.
368. Voutsadakis, I. A. Breast cancer sub-types display heterogeneity in gene amplification and mRNA expression of the anti-apoptotic members of BCL2 family / *Gene*. — 2023 Mar 20. — Vol. 857. — Art. no. 147179. — DOI: 10.1016/j.gene.2023.147179. — Epub 2023 Jan 7. — PMID: 36627096.
369. Wang, D., Bao, H. Abemaciclib is synergistic with doxorubicin in osteosarcoma pre-clinical models via inhibition of CDK4/6-Cyclin D-Rb pathway / *Cancer Chemother Pharmacol*. — 2022 Jan. — Vol. 89, No. 1. — P. 31-40. — DOI: 10.1007/s00280-021-04363-6. — Epub 2021 Oct 16. — PMID: 34655298.
370. Wang, G., Bai, Y., Cui, J., et al. Computer-Aided Drug Design Boosts RAS Inhibitor Discovery / *Molecules*. — 2022 Sep 5. — Vol. 27, No. 17. — Art. no. 5710. — DOI: 10.3390/molecules27175710. — PMID: 36080477. — PMCID: PMC9457765.
371. Wee, P., Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways / *Cancers (Basel)*. — 2017 May 17. — Vol. 9, No. 5. — Art. no. 52. — DOI: 10.3390/cancers9050052. — PMID: 28513565. — PMCID: PMC5447962.
372. Wennerberg, K., Rossman, K. L., Der, C. J. The Ras superfamily at a glance / *J Cell Sci*. — 2005 Mar 1. — Vol. 118, Pt. 5. — P. 843-6. — DOI: 10.1242/jcs.01660. — PMID: 15731001.
373. Wiechmann, S., Maisonneuve, P., Grebbin, B. M., et al. Conformation-specific inhibitors of activated Ras GTPases reveal limited Ras dependency of patient-derived cancer organoids / *J Biol Chem*. — 2020 Apr 3. — Vol. 295, No. 14. — P. 4526-4540. — DOI: 10.1074/jbc.RA119.011025. — Epub 2020 Feb 20. — PMID: 32086379. — PMCID: PMC7136003.
374. Wing, M. R., Bourdon, D. M., Harden, T. K. PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling / *Mol Interv*. — 2003 Aug. — Vol. 3, No. 5. — P. 273-80. — DOI: 10.1124/mi.3.5.273. — PMID: 14993441.
375. Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma / *Science*. — 1995 Sep 1. — Vol. 269, No. 5228. — P. 1281-4. — DOI: 10.1126/science.7652577. — PMID: 7652577.

376. Wong, K. K. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway / *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* — 2009 Jan. — Vol. 4, No. 1. — P. 28-35. — DOI: 10.2174/157489209787002461. — PMID: 19149686.
377. Wu, C. M., Huang, T. H., Xie, Q. D., et al. Construction of pETNF-P16 plasmid and its expression properties in EC9706 cell line induced by X-ray irradiation / *World J Gastroenterol.* — 2004 Oct 15. — Vol. 10, No. 20. — P. 2927-30. — DOI: 10.3748/wjg.v10.i20.2927. — PMID: 15378766. — PMCID: PMC4576245.
378. Wu, P., Chen, H., Jin, R., et al. Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration / *J Transl Med.* — 2018 Feb 15. — Vol. 16, No. 1. — Art. no. 29. — DOI: 10.1186/s12967-018-1402-1. — PMID: 29448962. — PMCID: PMC5815227.
379. Wu, P., Heins, Z. J., Muller, J. T., et al. Integration and Analysis of CPTAC Proteomics Data in the Context of Cancer Genomics in the cBioPortal / *Mol Cell Proteomics.* — 2019 Sep. — Vol. 18, No. 9. — P. 1893-1898. — DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001673. — Epub 2019 Jul 15. — PMID: 31308250. — PMCID: PMC6731080.
380. Wu, X., Song, W., Cheng, C., et al. Small molecular inhibitors for KRAS-mutant cancers / *Front Immunol.* — 2023 Aug 18. — Vol. 14. — Art. no. 1223433. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1223433. — PMID: 37662925. — PMCID: PMC10470052.
381. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., et al. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery / *J Control Release.* — 2012 Mar 28. — Vol. 158, No. 3. — P. 371-8. — DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.093. — Epub 2011 Oct 1. — PMID: 21982904.
382. Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., et al. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation / *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2003. — Vol. 100, No. 5. — P. 2363-2368. — DOI: 10.1073/pnas.0436813100.
383. Xiao, H., Wang, G., Zhao, M., et al. Ras superfamily GTPase activating proteins in cancer: Potential therapeutic targets? / *Eur J Med Chem.* — 2023 Feb 15. — Vol. 248. — Art. no. 115104. — DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115104. — Epub 2023 Jan 10. — PMID: 36641861.
384. Xie, X., Zhang, W., Zhou, X., et al. Abemaciclib drives the therapeutic differentiation of acute myeloid leukaemia stem cells / *Br J Haematol.* — 2023 Jun. — Vol. 201, No. 5. — P. 940-953. — DOI: 10.1111/bjh.18735. — Epub 2023 Mar 14. — PMID: 36916190.
385. Xu, J., Bian, X., Zhao, H., et al. Morphine Prevents Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Mitochondrial Damage by Activating δ -opioid Receptor/EGFR/ROS Pathway / *Cardiovasc Drugs Ther.* — 2022 Oct. — Vol. 36, No.

5. — P. 841-857. — DOI: 10.1007/s10557-021-07215-w. — Epub 2021 Jul 19. — PMID: 34279751.
386. Yamaguchi, T., Hayashi, M., Ida, L., et al. ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma / *Oncogene*. — 2019 Jun. — Vol. 38, No. 26. — P. 5142-5157. — DOI: 10.1038/s41388-019-0785-7. — Epub 2019 Mar 20. — PMID: 30894682.
387. Yang, N. J., Hinner, M. J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins / *Methods Mol Biol*. — 2015. — Vol. 1266. — P. 29-53. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2272-7_3. — PMID: 25560066. — PMCID: PMC4891184.
388. Yang, Y., Luo, J., Chen, X., et al. CDK4/6 inhibitors: a novel strategy for tumor radiosensitization / *J Exp Clin Cancer Res*. — 2020. — Vol. 39, No. 1. — Art. no. 188. — DOI: 10.1186/s13046-020-01693-w.
389. Yao, R., Zhang, M., Zhou, J., et al. Novel dual-targeting c-Myc inhibitor D347-2761 represses myeloma growth via blocking c-Myc/Max heterodimerization and disturbing its stability / *Cell Commun Signal*. — 2022. — Vol. 20. — Art. no. 73. — DOI: 10.1186/s12964-022-00868-6.
390. Ye, N., Ding, Y., Wild, C., et al. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) / *J Med Chem*. — 2014 Aug 28. — Vol. 57, No. 16. — P. 6930-48. — DOI: 10.1021/jm5004733. — Epub 2014 May 27. — PMID: 24831826. — PMCID: PMC4148154.
391. Ye, W., Lu, X., Qiao, Y., Ou, W. B. Activity and resistance to KRASG12C inhibitors in non-small cell lung cancer and colorectal cancer / *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. — 2024 May. — Vol. 1879, No. 3. — Art. no. 189108. — DOI: 10.1016/j.bbcan.2024.189108. — Epub 2024 May 8. — PMID: 38723697.
392. Ye, Z., Xu, S., Shi, Y., et al. GRB2 stabilizes RAD51 at reversed replication forks suppressing genomic instability and innate immunity against cancer / *Nat Commun*. — 2024 Mar 8. — Vol. 15, No. 1. — Art. no. 2132. — DOI: 10.1038/s41467-024-46283-y. — PMID: 38459011. — PMCID: PMC10923831.
393. Young, J. A., Tan, A. R. Trilaciclib: A First-in-class Therapy to Reduce Chemotherapy-induced Myelosuppression / *Oncol. Haematol*. — 2022. — Vol. 18. — P. 152–158. — DOI: 10.17925/OHR.2022.18.2.152.
394. Yuan, C., Selby, T. L., Li, J., et al. Tumor suppressor INK4: refinement of p16INK4A structure and determination of p15INK4B structure by comparative modeling and NMR data / *Protein Sci*. — 2000 Jun. — Vol. 9, No. 6. — P. 1120-8. — DOI: 10.1110/ps.9.6.1120. — PMID: 10892805. — PMCID: PMC2144649.

395. Yuan, Y., Wu, D., Hou, Y., et al. Wnt signaling: Modulating tumor-associated macrophages and related immunotherapeutic insights / *Biochem Pharmacol.* — 2024 May. — Vol. 223. — Art. no. 116154. — DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116154. — Epub 2024 Mar 19. — PMID: 38513742.
396. Zakany, F., Mándity, I. M., Varga, Z., et al. Effect of the Lipid Landscape on the Efficacy of Cell-Penetrating Peptides / *Cells.* — 2023 Jun 23. — Vol. 12, No. 13. — Art. no. 1700. — DOI: 10.3390/cells12131700. — PMID: 37443733. — PMCID: PMC10340183.
397. Zaman, S. U., Pagare, P. P., Huang, B., et al. Novel PROTAC probes targeting FOSL1 degradation to eliminate head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells / *Bioorg Chem.* — 2024 Oct. — Vol. 151. — Art. no. 107613. — DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107613. — Epub 2024 Jul 9. — PMID: 39002513. — PMCID: PMC11365795.
398. Zanotti, S., Vanhauwaert, S., Van Neste, C., et al. MYCN-induced nucleolar stress drives an early senescence-like transcriptional program in hTERT-immortalized RPE cells / *Sci Rep.* — 2021 Jul 14. — Vol. 11, No. 1. — Art. no. 14454. — DOI: 10.1038/s41598-021-93863-9. — PMID: 34262099. — PMCID: PMC8280219.
399. Zeng, F. C., Zhou, Y., Khowtanapanich, T., Saengboonmee, C. Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors: A Potential Breakthrough Therapy for Malignancies of Gastrointestinal Tract / *In Vivo.* — 2022. — Vol. 36, No. 4. — P. 1580–90. — DOI: 10.21873/invivo.12868.
400. Zeverijn, L. J., Looze, E. J., Thavaneswaran, S., et al. Limited clinical activity of palbociclib and ribociclib monotherapy in advanced cancers with cyclin D-CDK4/6 pathway alterations in the Dutch DRUP and Australian MoST trials / *Int J Cancer.* — 2023. — Vol. 153. — P. 1413–1422. — DOI: 10.1002/ijc.34649.
401. Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., et al. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development / *Am J Cancer Res.* — 2021 May 15. — Vol. 11, No. 5. — P. 1913-1935. — PMID: 34094661. — PMCID: PMC8167670.
402. Zhang, W., Bradburn, D., Heidebrink, G., et al. Distinct allosteric networks in CDK4 and CDK6 in the cell cycle and in drug resistance [Preprint] / *bioRxiv.* — 2025 Mar 6. — Art. no. 2025.02.28.640857. — DOI: 10.1101/2025.02.28.640857. — Update in: *J Mol Biol.* 2025 Mar 31:169121. — PMID: 40093074. — PMCID: PMC11908124.
403. Zhang, W., Liu, Y., Jang, H., Nussinov, R. Cell cycle progression mechanisms: slower cyclin-D/CDK4 activation and faster cyclin-E/CDK2 [Preprint] / *bioRxiv.* — 2023 Aug 17. — Art. no. 2023.08.16.553605. — DOI: 10.1101/2023.08.16.553605. — PMID: 37790340. — PMCID: PMC10542123.

404. Zhang, X., Zhang, X., Geng, D., et al. Targeted therapy for multiple gene mutations in multiple metastases of advanced gastric cancer: a case report / *Front Oncol.* — 2023 Dec 15. — Vol. 13. — Art. no. 1257011. — DOI: 10.3389/fonc.2023.1257011. — PMID: 38162498. — PMCID: PMC10755568.
405. Zhang, Y., Xing, Z., Mi, L., et al. Targeted therapy and drug resistance in thyroid cancer / *European Journal of Medicinal Chemistry.* — 2022. — Vol. 238. — Art. no. 114500. — DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114500. — EDN: AIPKES.
406. Zhang, Z., Liu, D., Lv, R., et al. FBL Promotes LPS-Induced Neuroinflammation by Activating the NF- κ B Signaling Pathway / *J Inflamm Res.* — 2024 Apr 11. — Vol. 17. — P. 2217-2231. — DOI: 10.2147/JIR.S451049. — PMID: 38623466. — PMCID: PMC11018134.
407. Zhang, Z. T., Xiao, W. W., Li, L. R., et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy versus neoadjuvant chemotherapy for initially unresectable locally advanced colon cancer: short-term outcomes of an open-label, single-centre, randomised, controlled, phase 3 trial / *EClinicalMedicine.* — 2024 Sep 21. — Vol. 76. — Art. no. 102836. — DOI: 10.1016/j.eclinm.2024.102836.
408. Zhang, W., Gao, S., Wang, L., et al. Preclinical Evaluation of a Radiolabeled Pan-RAF Inhibitor for RAF-Specific PET/CT Imaging / *Molecular Pharmaceutics.* — 2024 Sep 20. — DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00649.
409. Zhao, H., Piwnica-Worms, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1 / *Mol Cell Biol.* — 2001 Jul. — Vol. 21, No. 13. — P. 4129-39. — DOI: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001. — PMID: 11390642. — PMCID: PMC87074.
410. Zhao, J., Zou, Y., Liu, H., et al. TEIF associated centrosome activity is regulated by EGF/PI3K/Akt signaling / *Biochim Biophys Acta.* — 2014 Sep. — Vol. 1843, No. 9. — P. 1851-64. — DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.021. — Epub 2014 Apr 25. — PMID: 24769208.
411. Zhao, S., Liu, M., Chen, J., et al. Pathophysiological impacts of 5-MeO-MiPT on zebrafish (*Danio rerio*) via the G α q/11-PLC β signaling pathway / *Ecotoxicol Environ Saf.* — 2024 Sep 15. — Vol. 283. — Art. no. 116969. — DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116969. — Epub 2024 Aug 30. — PMID: 39216220.
412. Zhao, Y., Yu, Y., Zhao, W., et al. As a downstream target of the AKT pathway, NPTX1 inhibits proliferation and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma / *Biosci Rep.* — 2019 Jun 4. — Vol. 39, No. 6. — Art. no. BSR20181662. — DOI: 10.1042/BSR20181662. — PMID: 31113871. — PMCID: PMC6549097.

413. Zhu, W., Yu, Y., Fang, K., et al. miR-31/QKI-5 axis facilitates cell cycle progression of non-small-cell lung cancer cells by interacting and regulating p21 and CDK4/6 expressions / *Cancer Med.* — 2023 Feb. — Vol. 12, No. 4. — P. 4590-4604. — DOI: 10.1002/cam4.5309. — Epub 2022 Sep 29. — PMID: 36172919. — PMCID: PMC9972157.
414. Zhu, Z., Zhu, Q. Differences in metabolic transport and resistance mechanisms of Abemaciclib, Palbociclib, and Ribociclib / *Front Pharmacol.* — 2023. — Vol. 14. — Art. no. 1212986. — DOI: 10.3389/fphar.2023.1212986.
415. Ziebold, U., Lee, E. Y., Bronson, R. T., Lees, J. A. E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas / *Mol Cell Biol.* — 2003 Sep. — Vol. 23, No. 18. — P. 6542-52. — DOI: 10.1128/MCB.23.18.6542-6552.2003. — PMID: 12944480. — PMCID: PMC193688.
416. Ziegler, A., Nervi, P., Dürrenberger, M., Seelig, J. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence / *Biochemistry.* — 2005 Jan 11. — Vol. 44, No. 1. — P. 138-48. — DOI: 10.1021/bi0491604. — PMID: 15628854.
417. Zinatizadeh, M. R., Zarandi, P. K., Akbari, M. E., et al. The Role and Function of Ras-association domain family in Cancer: A Review / *Genes & Diseases.* — 2019. — Vol. 6, No. 4. — P. 378-384. — DOI: 10.1016/j.gendis.2019.07.008.
418. Zou, J., Wang, D., Yin, G., et al. Prognostic significance of p27 in colorectal cancer: a meta-analysis and bioinformatics analysis / *Front Oncol.* — 2024 Dec 23. — Vol. 14. — Art. no. 1495476. — DOI: 10.3389/fonc.2024.1495476. — PMID: 39845325. — PMCID: PMC11751620.
419. Zou, Y., Han, D., Zhou, Y., et al. Design, Synthesis, and Antitumor Activity of Stapled Peptide Inhibitors Targeting the Ras–Raf Interactions [Preprint] / *SSRN.* — 2025 Jan 1. — Art. no. 5082681. — DOI: 10.2139/ssrn.5082681.