

## Programma

„Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai”

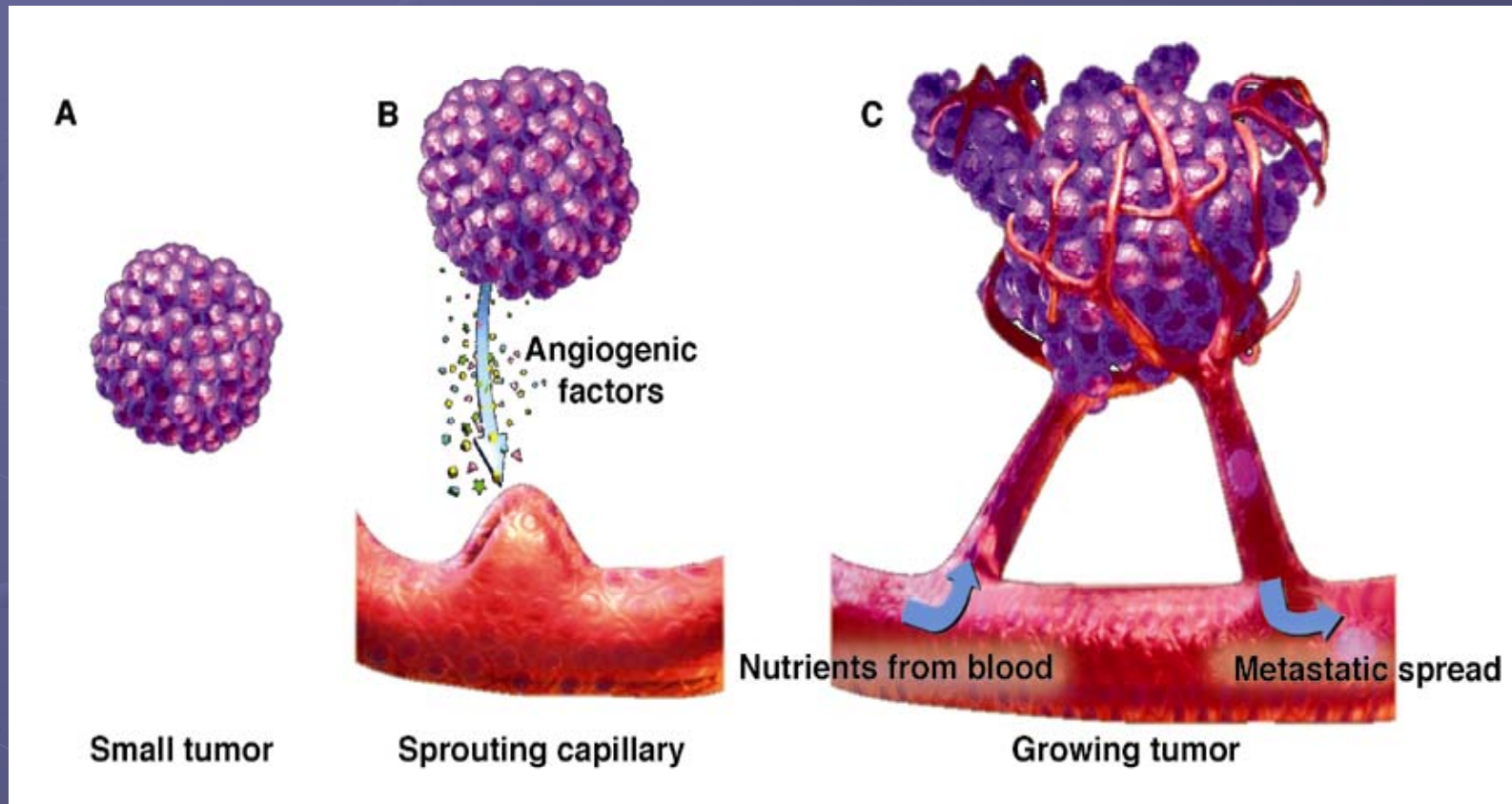
### Projekts Nr. 6 „Pretvēža terapijas un vēža metastazēšanos inhibējošu medikamentu izpēte”

Projekta vadītāji: Ainārs Leončiks (LBMC)  
Irina Šestakova (LOSI)

#### Projekta uzdevumi

1. MMP inhibējošās aktivitātes noteikšana jaunsintezētām vielām, izmantojot fluorimetrisku atlasē sistēmu
2. Jaunsintezēto MMP inhibitoru kompleksa testētēšana, pārbaudot to toksiskumu uz normālām šūnām, citotoksicitāti, izmantojot vēža monoslāņu šūnas un ietekmi uz angiogēnēzi *in vitro* un *in vivo*
3. Perspektīvāko pretvēžu savienojumu atlase tālākai izpētei *in vivo* ņemot vērā iepriekšējo pārbaužu rezultātus

# Vēzis un asinsvadu attīstība (angiogēnēze)



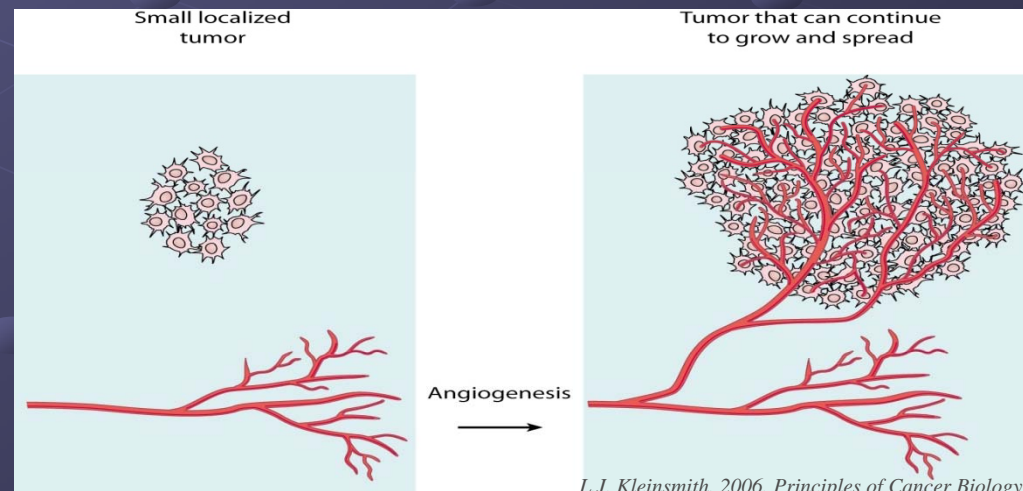
A, Audzējs 1-2 mm<sup>3</sup> saņem skābekli un barības vielas difūzijas ceļā

B, Lielam audzējam nepieciešama asinsvadu sistēma. Audzējs sekretē angiogēnus faktorus, kas stimulē endotēlija šūnu migrāciju, proliferāciju un jaunu asinsvadu veidošanos no esošajiem asinsvadiem

C, Jauns vaskularizēts audzējs iegūst spēju augt un metastazēt

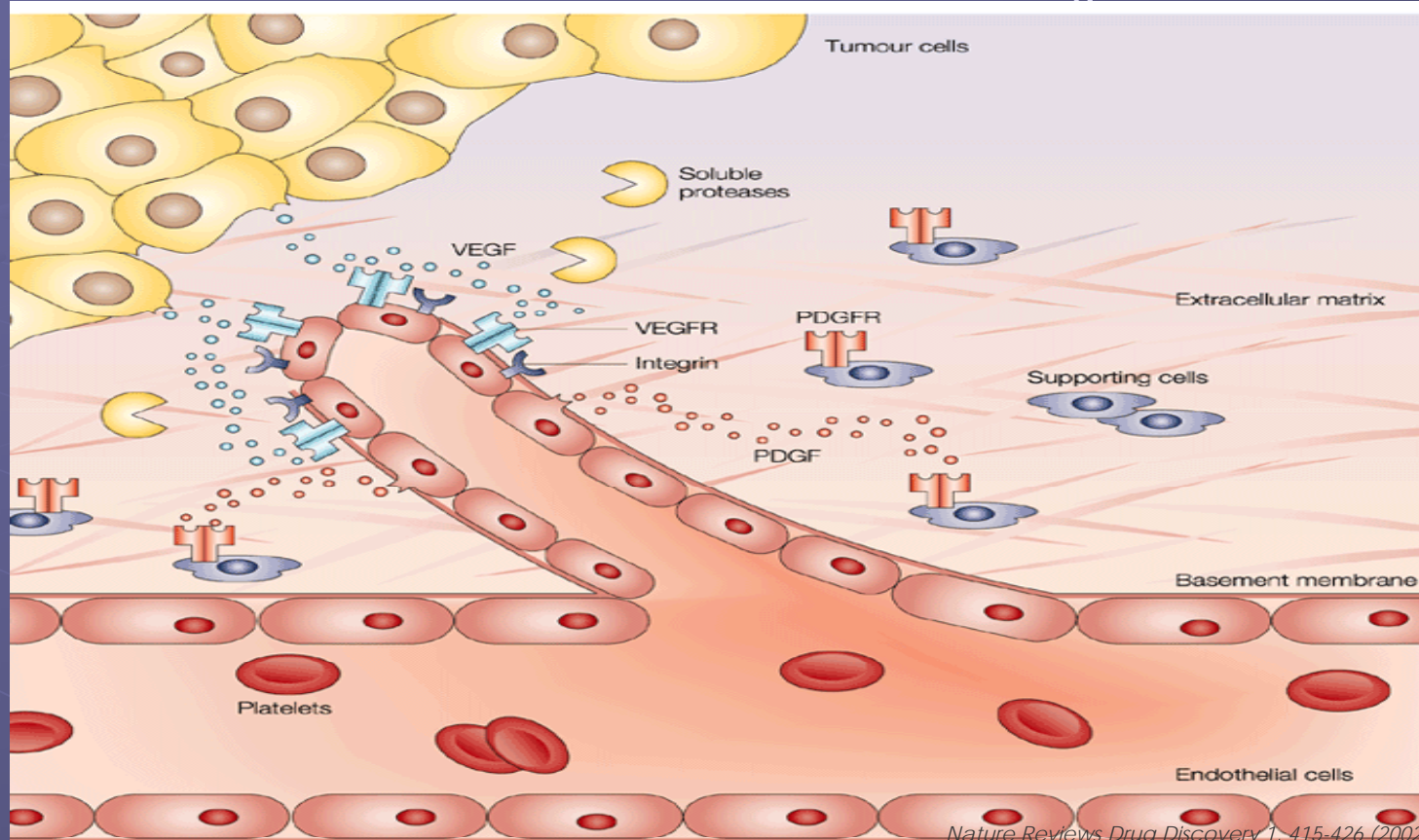
# Angioģenēze

- Komplekss bioloģisks process, kurā veidojas jauni asinsvadi no esošajiem
- Iesaistīti dažādi šūnu tipi, ārpusšūnas matrikss u.c. faktori
- Sinonīmi: vaskuloģenēze, arterioģenēze
- **Fizioloģisks:** embrionālā attīstība, ievainojumu dzīšanas procesi u.c.
- **Patoloģisks:** vēzis, retinopātija, artrīts u.c.
- **Atšķirības:** ilgums, organisma kontrole, anatomiskas un fizioloģiskas asinsvadu atšķirības



L.J. Kleinsmith, 2006, Principles of Cancer Biology

# Jaunu asinsvadu veidošanās: audzēja izdzīvošana



## Audzēja izdzīvošana un izplatīšanās

- Audzējam nepieciešama papildus asinsapgāde, pretējā gadījumā iestājas badošanās, tāpēc šūnas aktīvi sekretē proangiogēniskus faktorus (VEGF, PDGF), kas stimulē asinsvadu veidošanos

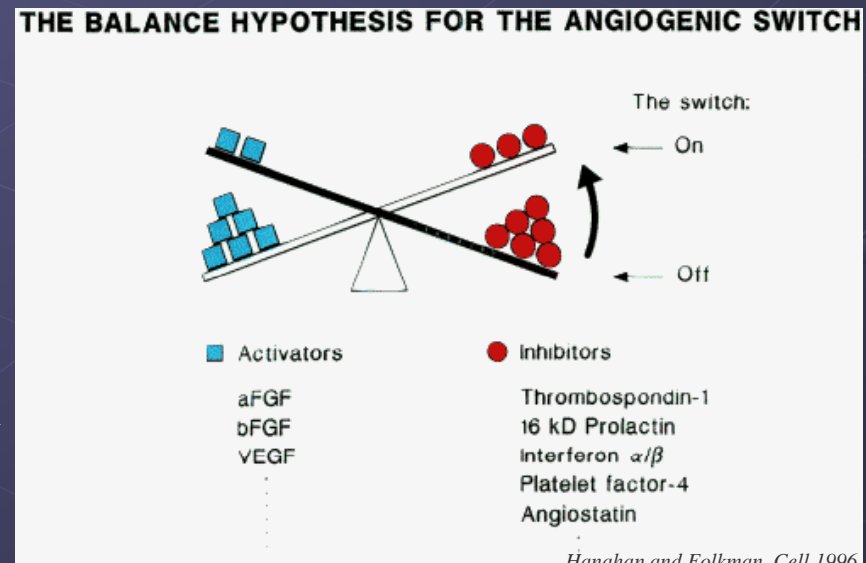
## Anti-angiogēneses savienojumi:

- Inhibē augšanas faktorus (VEGF), proteāžu aktivitāti un atjauno balansu starp augšanu stimulējošiem un augšanu inhibējošiem faktoriem, aptur asinsvadu veidošanos un palēnina audzēja šūnu augšanu

# Angioģenēze: attīstība un balanss

1. Endotēlija šūnas (veido asinsvadu iekšējās virsmas slāni)
2. EŠ stimulācija: angiokinīni, matricas metaloproteināzes (MMP), heparināzes, VEGF (vascular endothelial growth factor)
3. Ārpusšūnas matricas (ECM) proteolītiska degradācija
4. EŠ starpšūnu saišu sairšana
5. Asinsvada kanāla atvēršanās
6. Augšanas faktori stimulē EŠ vairošanos un pārvietošanos degradētajā ECM
7. Jaunas EŠ veido tubulāru struktūru jauna asinsvada attīstībai

- Normālos audos, anti-angioģenēzes faktori dominē pār angioģenēzi stimulējošiem faktoriem
- Audzēja šūnu izdzīvošanai, attīstībai un metastazēšanai kritisks faktors

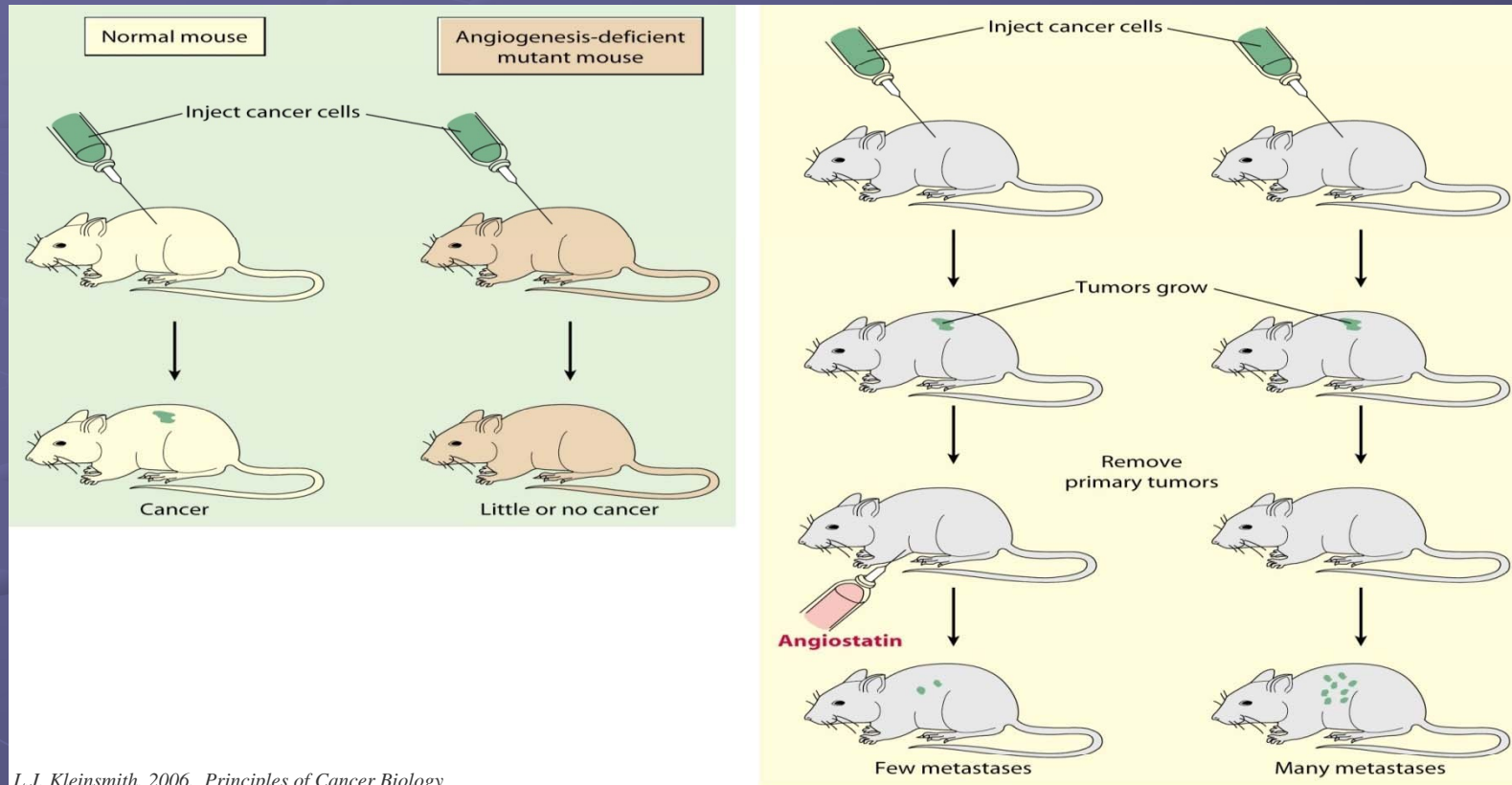


*Hanahan and Folkman, Cell 1996*

# Nozīmīgākie angiogēnēzes dabiskie regulatori

<u>Angiogēnēzes stimulatori</u>	<u>Angiogēnēzes inhibitori</u>
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Angiostatīns
bFGF (FGF-2)/aFGF (FGF-1)	Endostatīns
HGF (hepatocyte growth factor)	Vazostatīns
PDGF (platelet-derived growth factor)	Tumstatīns
TGF $\alpha$ (transforming growth factor)	Trombospondīns
TGF $\beta$	Angiopoetīns – 1
IGF-1 (insulin-like growth factor)	Aktivīns A
Trombīns	IFN $\alpha$
TNF $\alpha$ (mazās devās)	TNF $\alpha$ (lielās devās)
Interleikīni (IL-1, IL-6, IL-8)	Interleikīns (IL-12)
Angiopoetīns-2	bFGF receptora sekretorā forma
Eritropoetīns	VEGFR receptora sekretējošā forma
MMP-1, -2, -9	TIMP-1, -2, -3
PGF (placental growth factor)	Platelet factor 4
Prostaglandīns E1 & E2	Prolaktīna 16kD fragments
Angiogenīns	Angiotenzīns
Scatter factor	

# Angiogenēzes inhibitoru loma kancerogēnēzē

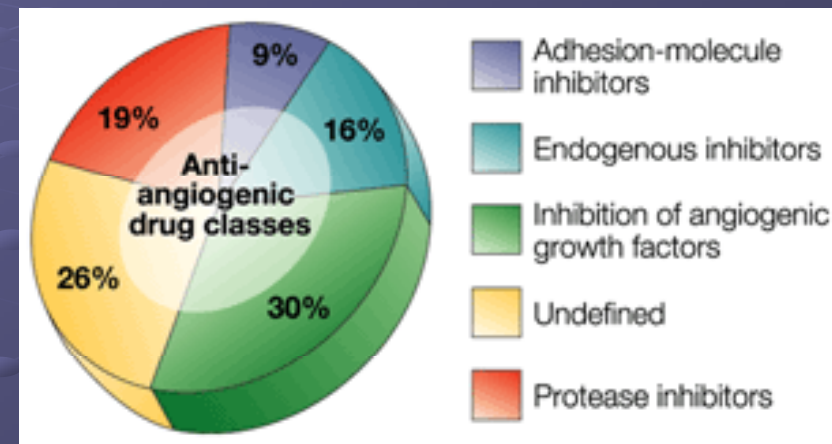


L.J. Kleinsmith, 2006, *Principles of Cancer Biology*

# Angioterapija: angiogēnēzes inhibēšana

Anti-angiogēnēzes faktori: 5 kategorijas

- Šūnas **adhēzijas** molekulu inhibitori
- Endogēno **angiogēnēzes** inhibitoru: (piem. endostatin) analogi
- Angiogēnēzes **augšanas faktoru** (VEGF, bFGF (FGF-2), PDGF) inhibitori
- Savienojumi ar nezināmu mehānismu
- **Proteāžu** inhibitori: novērš ārpusšūnas matriksa šķelšanu, nepieciešamu jaunu asinsvadu veidošanai



**Antiangiogēnēzes zāļu mērķis:**

- Iedarbība uz vēža šūnām
- Jaunu asinsvadu veidošanās bloķēšana, audzēja asinsapgādes samazināšana
- Audzēja augšanas un izplatības apturēšana (esošās asinsapgādes bloķēšana)



# Angioģenēzes terapijas priekšrocības

- ✓ Neatkarīgs no rezistences mehānismiem
- ✓ Pielietojams dažādiem vēžu tiem
- ✓ Viegla medikamentu piekļuve (asinsvadi)
- ✓ Minimāli blakusefekti

- ❖ Cetuximab (ERBITUX)
- ❖ Transtuzumab (HERCEPTIN)

*mAbs pret EGFR and ErbB2*

- ❖ Bevacizumab (AVASTIN)

*mAbs pret VEGF*

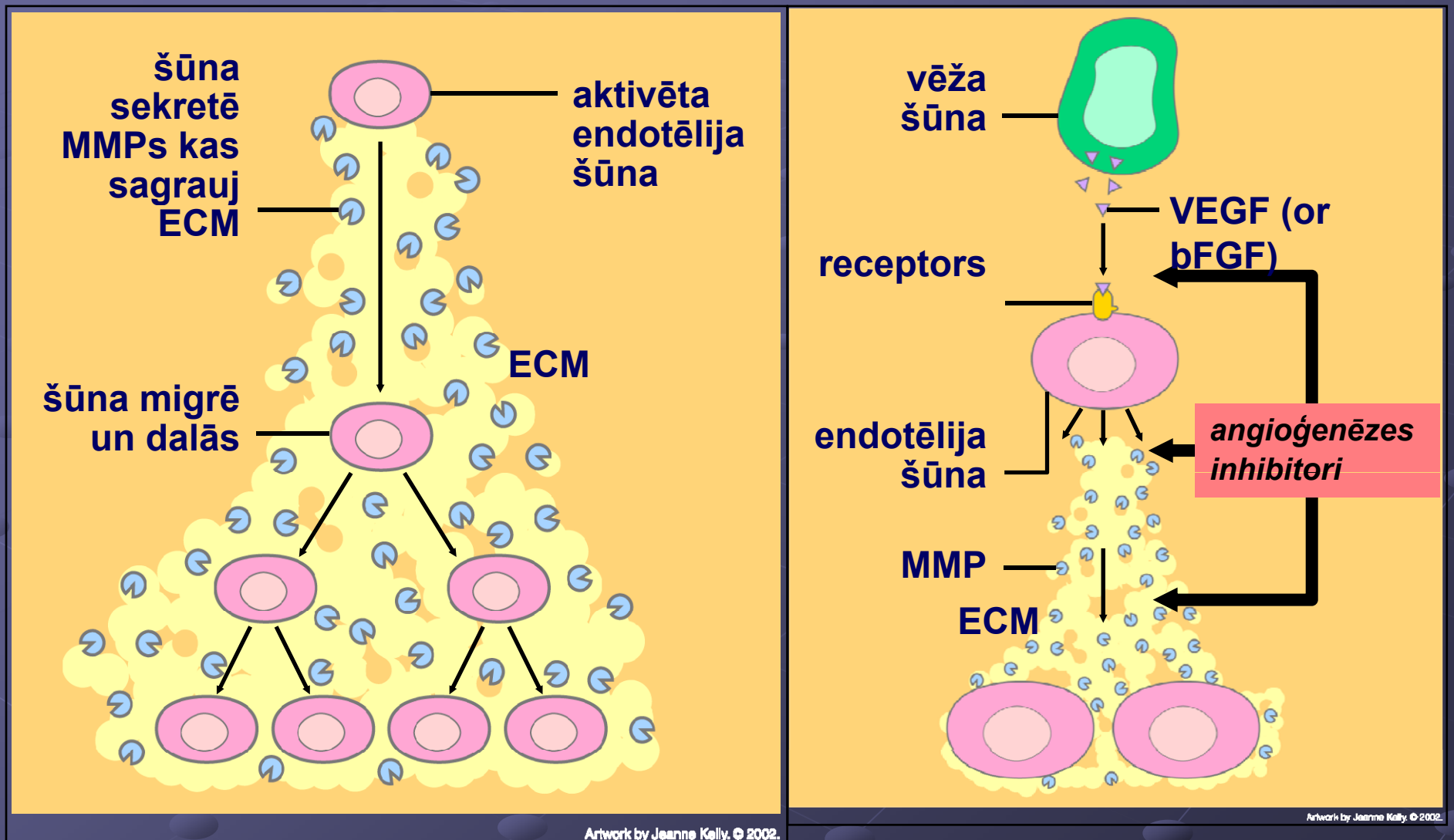
- ❖ Gefitinib (IRESSA)
- ❖ Erlotinib (TARCEVA)

*Tyrosine kinase inhibitori (ATP)*

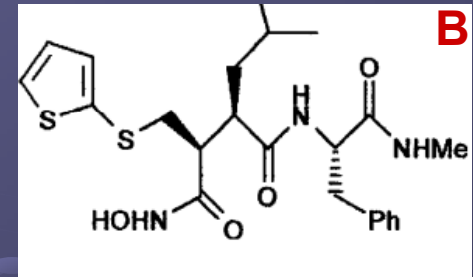
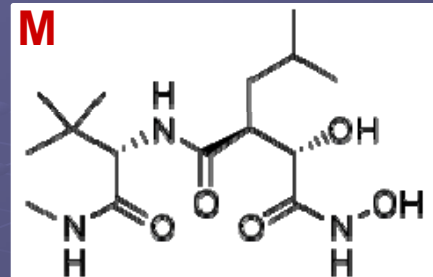
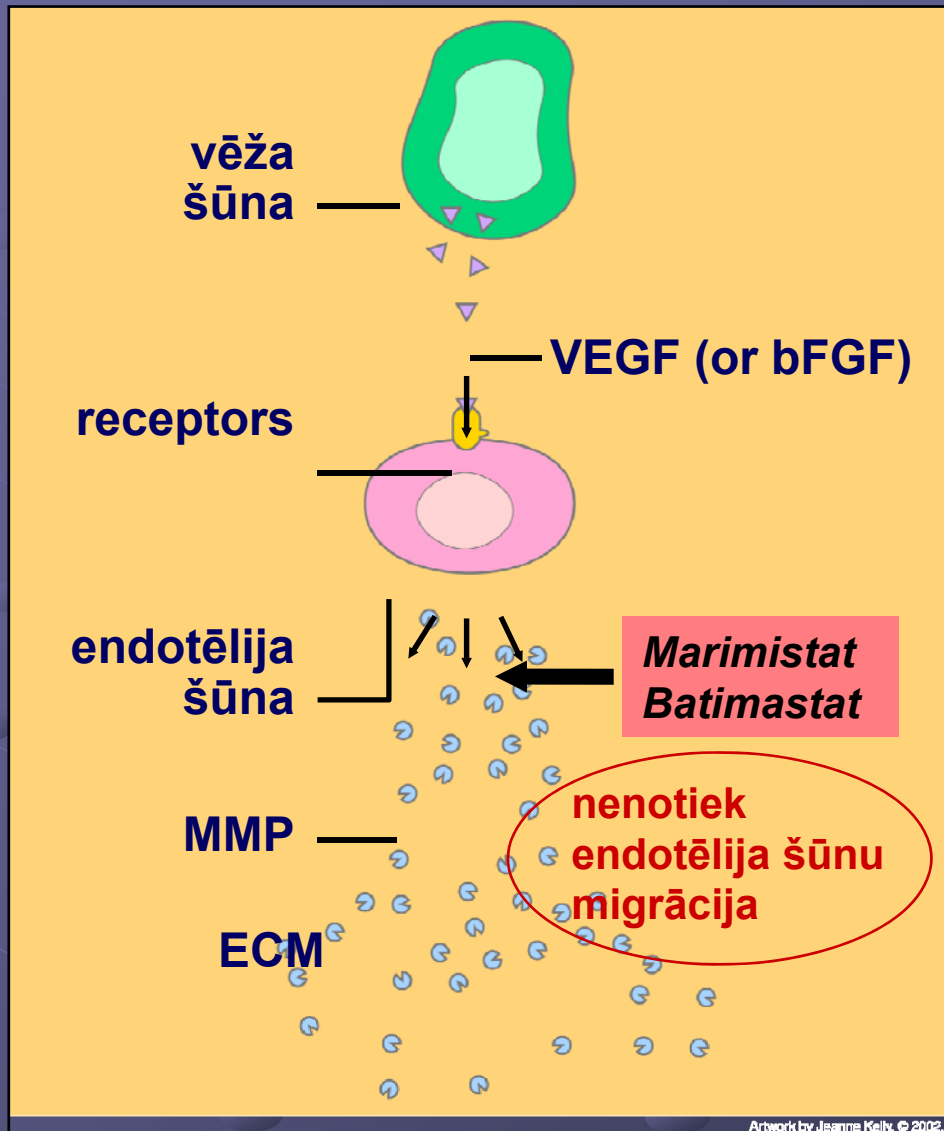
- ❖ Batimastat (BB-94)
- ❖ Marimastat (BB-2516)

*MMP inhibitori*

# MMP loma angiogēnēzes un metastāžu veidošanās procesos



# MMP inhibitori kā zāles



## Marimastat (M)

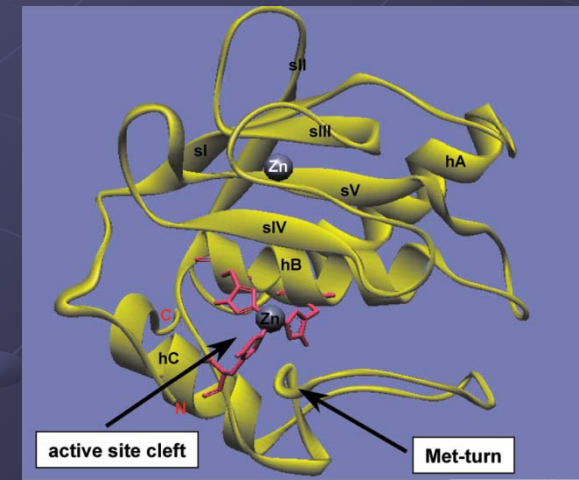
- > Saistās ar cinka jonu
- > Samērā toksisks, nepieciešams pielietot citotoksiskās kombinācijās

## Batimastat (B)

- > Ļoti stipri saistās ar cinka jonu katalītiski aktīvajā centrā
- > Intraperitoneāla ievadīšana

# Matriksa metaloproteināzes

- MMP - cinka saturošas metallo-endo-peptidāzes (proteāžu saime)
  - šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija/adhēzija, apoptoze, (in)aktivācija, angiogēnēze, imūnatbildes
  - šūnā sintezētas latentā formā (neaktīvs zīmogēns)
  - secretētas proenzīma formā, nepieciešama ekstracelulāra aktivācija
  - kalcija joni nepieciešami struktūras stabilizācijai un katalītiskai funkcijai
  - regulē endogēni audu MMP inhibitori (TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinases*)
  - trīs domēni: pro-peptīds, katalītiskais domēns, (*haemopexin-like*) C-gala domēns
  - konservatīvs reģions: PRCGxPD ar Cys atlikumu
  - proteolīzes mērķobjekts: bazālā membrāna, ECM komponenti (+ Ser, Cys, Asp proteāzes)
- ~30 enzīmu:  $\geq 4$  grupās atkarībā no strukturālām atšķirībām un substrāta specifiskuma
  - Šķīstoša un sekretējama grupa: *collagenase*, *gelatinase*, *stromelysins*
  - Membrānas tipa grupa: plazmas membrānā



# Angioģenēzes un metastazēšanās procesos iesaistītās metaloproteināzes

## Kolagenāzes

MMP-1  
(intersticiālā kolagenāze)  
MMP-13  
(kolagenāze-3)

## Želatināzes

MMP-2  
(želatināze A)  
MMP-9  
(želatināze B)

## Matrilizīns

MMP-7  
(matrilizīns,  
PUMP)

## Stromelizīni

MMP-3  
(stromelizīns-1)  
MMP-10  
(stromelizīns-2)  
MMP-11  
(stromelizīns-3)

## Membrānas tipa

### MPP

MMP-14  
(MT1-MMP)  
MMP-16  
(MT3-MMP)

### Citas MPP

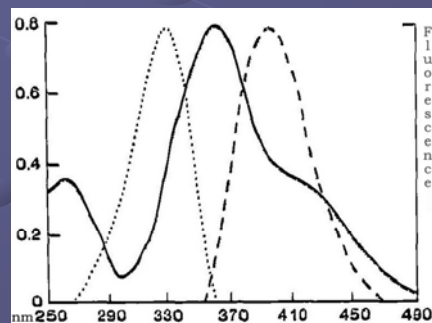
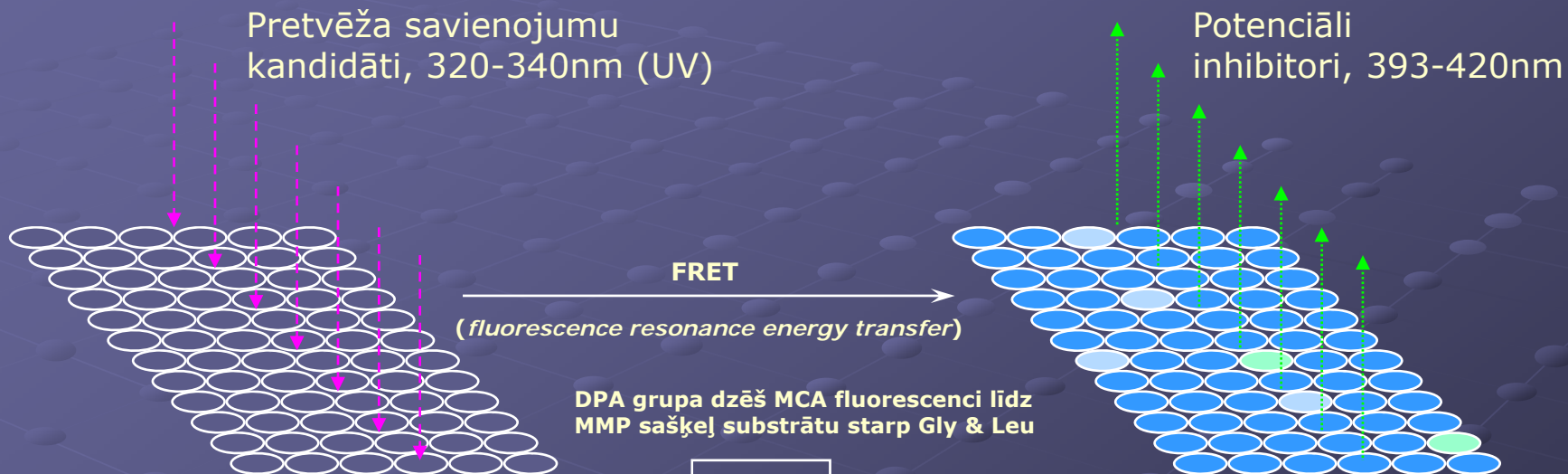
MMP-12  
(MME-makrofāgu metaloelastāze)

<u>Enzyme</u>	<u>MMP #</u>	<u>Substrate</u>
<b>Fibroblast-type collagenase</b>	<b>MMP-1</b>	<b>Collagen I, II, III VII, VIII, X, gelatine</b>
<b>Polymorphonuclear-type collagenase</b>	<b>MMP-8</b>	<b>Same as MMP-1</b>
<b>Stromelysin-1</b>	<b>MMP-3</b>	<b>Collagen IV, V, IX, X; laminin fibronectin, elastin</b>
<b>Stromelysin-2</b>	<b>MMP-10</b>	<b>Same as MMP-3</b>
<b>72 kDa gelatinase</b>	<b>MMP-2</b>	<b>Gelatin; collagen IV, V, VII, X, XI; elastin, fibronectin</b>
<b>92 kDa gelatinase</b>	<b>MMP-9</b>	<b>Gelatin; collagen IV, V; elastin</b>

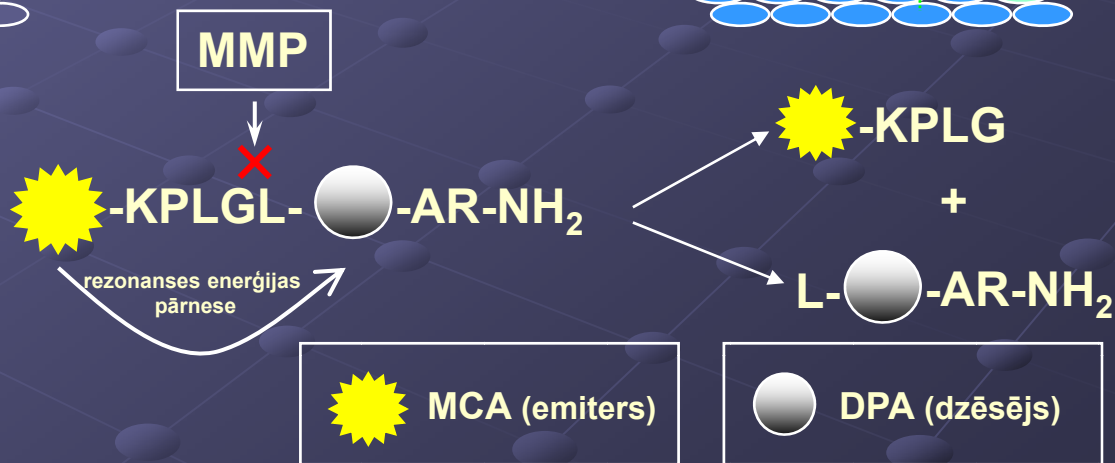
# Eksperimentālā pieeja

- Vielu pārbaude pēc to spējas inhibēt MMP aktivitāti izmantojot fluorescentu atlasē sistēmu (HTS)
- Vielu citotoksicitātes noteikšana izmantojot monoslāņu kultūras un spektrofotometriski nosakot izdzīvojošo šūnu skaitu (CV, MTT)
- Kapilāru tīkla struktūras veidošanās noteikšana *in vitro* dažādu vielu klātbūtnē endotēlija šūnu līnijai HUVEC-2 izmantojot polimerizētu matrigēlu
- Asinsvadu veidošanās analīze *in vivo* izmantojot dzīvnieku modeli un nosakot asinsvadu blīvumu matrigēlā un audzējā
- Metastazēšanās pētīšana izmantojot invazīvas peļu šūnu līnijas matrigēla kamērā *in vitro*

# MMP inhibitoru atlase izmantojot fluorogēnu peptīda substrātu (HTS)



Spektru pārklāšanās MCA un DPA grupām. DPA absorbcijas spektrs (—), MCA fluorescences ierosmes (···) un emisijas (---) spektri.



**MCA-Lys-Pro-Leu-Gly~Leu-DPA-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>**  
**DPA:** N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl  
**MCA:** (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl,

# MMP aktivitāti inhibējošie savienojumi

Vielas, 20µM	Metaloproteināzes, izoformas									
	MMP 1	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8	MMP 9	MMP 10	MMP 12	MMP 13	MMP 14
9526	11,68%	0%	19,63%	19,08%	30%	18,27%	22%	22,38%	30,88%	17,53%
9571	32,07%	29,93%	11,43%	17,96%	37,84%	29,46%	35,34%	35,71%	32,68%	37,44%
9580	27,57%	0%	8,91%	11,78%	18,31%	22,60%	29,14%	15,58%	13,61%	23,87%
9581	36,25%	35,65%	16,97%	18,63%	32,68%	27,94%	37,31%	32,73%	28,12%	33,22%
9582	14,03%	0%	19,12%	17,55%	36,04%	17,63%	22,83%	24,33%	36,67%	31%
9587	51,48%	53,37%	18,92%	26,98%	48,16%	37,54%	53,54%	51,77%	35,09%	44,87%
9609	30,17%	18,94%	27,45%	21,28%	29,95%	21,26%	27,36%	22,43%	16,82%	24,52%
9623	28,59%	18,62%	28,21%	20,23%	29,04%	20,47%	30,63%	38,00%	16,03%	26,76%
9624	45,00%	32,22%	19,20%	17,54%	37,10%	19,52%	36,16%	39,25%	23,75%	34,73%
9625	42,22%	37,26%	18,15%	22,57%	32,55%	34,54%	45,93%	35,98%	23,47%	38,34%
9626	0%	71,20%	50,83%	30,86%	25,13%	18,12%	32,73%	22,83%	61,11%	37,63%
9627	23,13%	0%	17,22%	22,40%	42,58%	25,69%	24,10%	15,81%	23,12%	36,06%
9628	32,29%	29,51%	19,35%	17,03%	31,18%	21,93%	36,00%	33,91%	34,93%	24,17%
9646	38,70%	28,07%	20,32%	21,30%	36,95%	18,98%	29,23%	29,55%	18,68%	32,69%
9648	24,99%	58,14%	32,42%	31,08%	29,09%	14,87%	24,46%	20,41%	30,17%	32,30%
9649	40,96%	24,35%	17,33%	18,80%	35,93%	20,28%	32,20%	30,41%	19,08%	35,76%
9663	42,42%	40,38%	17,70%	23,23%	44,28%	36,05%	28,12%	43,50%	32,85%	42,89%
9664	14,66%	57,98%	27,41%	19,83%	21,34%	9,95%	5,21%	21,27%	51,22%	23,38%
9665	41,09%	44,83%	19,44%	37,46%	44,40%	37,42%	46,68%	48,71%	27,15%	51,73%
9704	27,57%	23,32%	7,31%	13,47%	26,52%	24,96%	32,79%	29,40%	16,72%	26,95%
J-8-120	20,39%	12,55%	43,70%	13,51%	30,25%	13,12%	16,06%	43,96%	12,08%	11,77%
10149MOK	45,01%	47,76%	37,05%	50,67%	42,77%	39,88%	50,20%	39,54%	40,57%	55,53%

Std. inh. NNGH = 100%

Inh. >25%

Inh. >40%

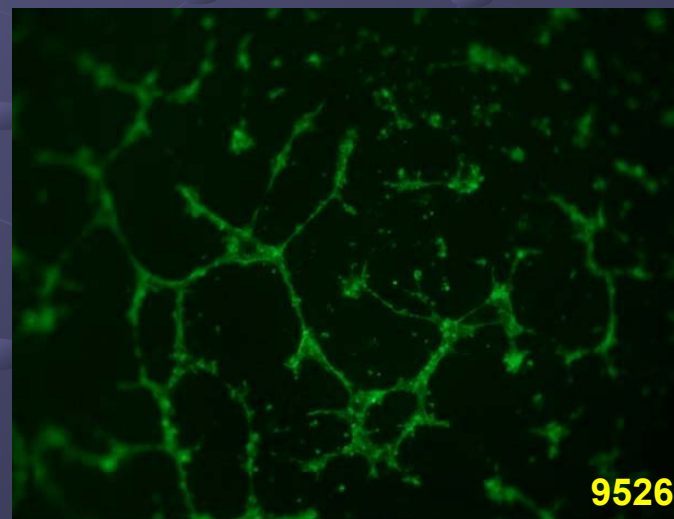
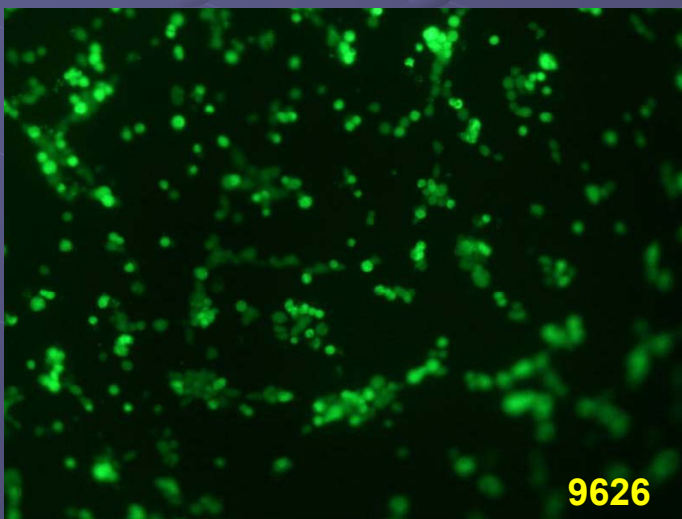
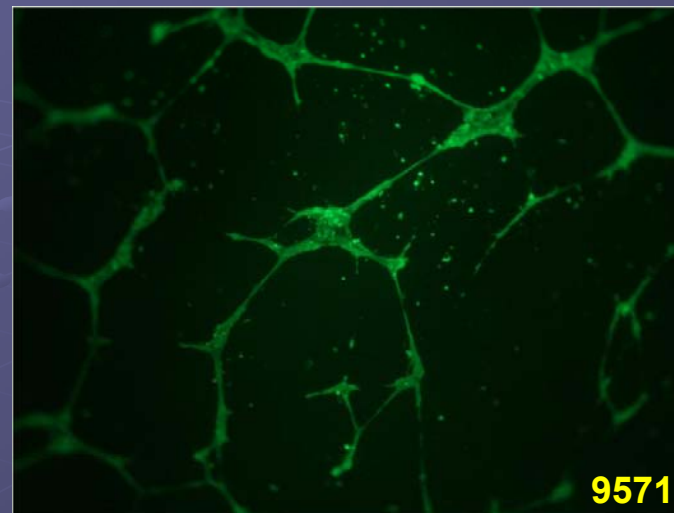
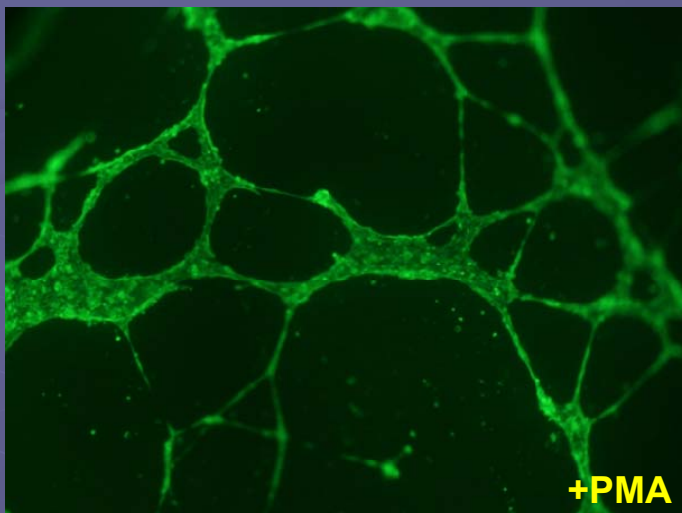
Inh. >60%



# MMP inhibitoru citotoksicitātes, vielu toksiskuma un angiogēnēzes inhibīcijas pārbaude

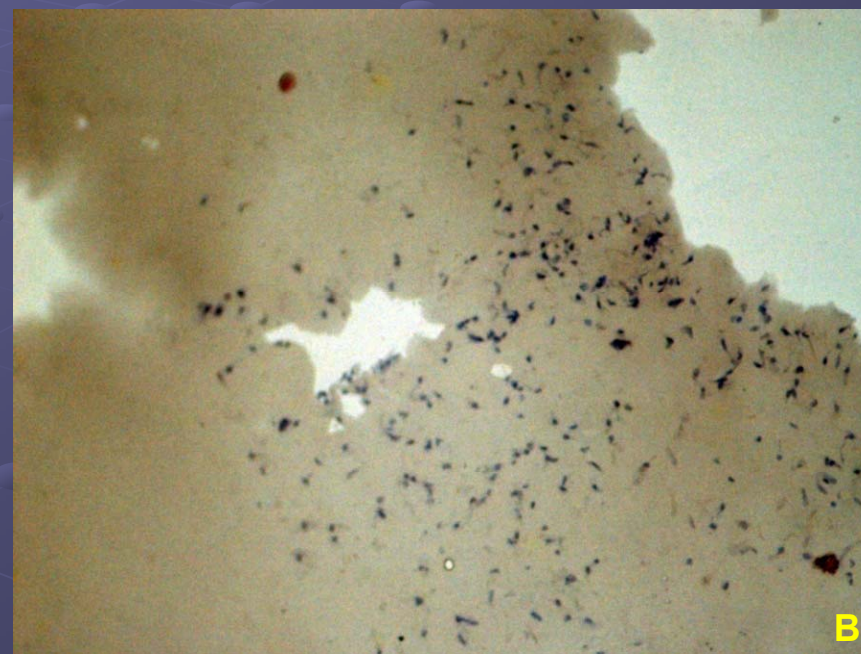
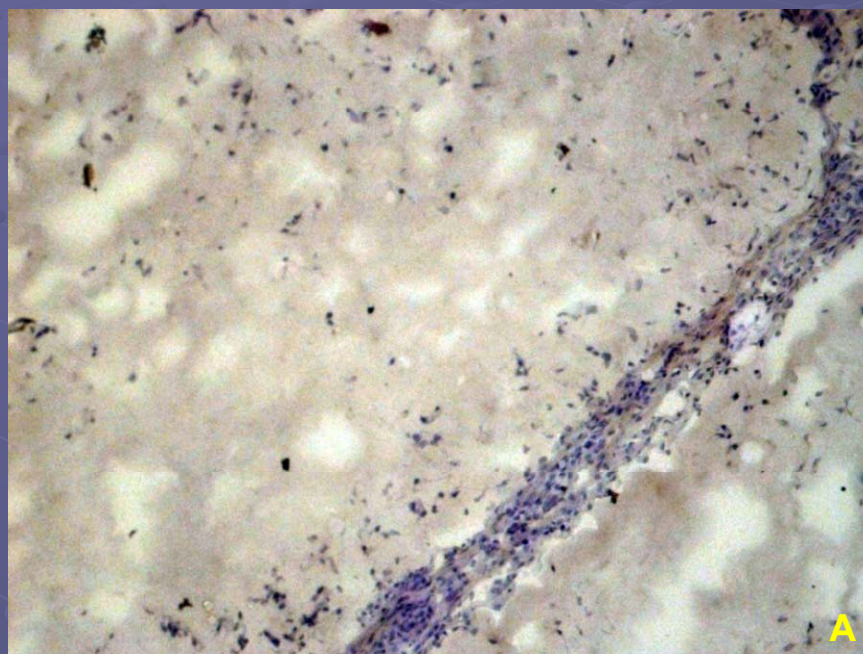
Vielas	IC <sub>50</sub> μg/ml <i>CV, MTT</i> <b>MG-22A</b> <b>HT-1080</b> <i>Graph Pad</i> <i>Prism</i>	LD <sub>50</sub> μg/g <i>NeutrRed</i> <b>3T3</b>	MMP		Angiogēnēzes inhibīcija (%)	
			MMP klase	Vid.inhib.,% <b>20μM</b>	<i>in vitro</i> <b>20μM</b> <i>ImagePro</i> <i>Plus4.1</i>	<i>in vivo</i> <b>10mM</b> <i>ImagePro</i> <i>Plus5.1</i>
<b>9571</b>	<b>2.5</b>	<b>177</b>	<b>MMP 1, 8, 10, 12-14</b>	<b>35</b>	<b>60</b>	<b>43</b>
<b>9582</b>	<b>1.3</b>	<b>309</b>	<b>MMP 8, 13, 14</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>26</b>
<b>9587</b>	<b>25</b>	<b>608</b>	<b>MMP 1, 2, 7-10, 12-14</b>	<b>47</b>	<b>61</b>	<b>65</b>
<b>9626</b>	<b>3</b>	<b>180</b>	<b>MMP 2, 3, 7, 8, 10, 13, 14</b>	<b>48</b>	<b>100</b>	<b>46</b>
<b>9628</b>	<b>2.0</b>	<b>191</b>	<b>MMP 1, 10, 12, 13</b>	<b>34</b>	<b>38</b>	<b>37</b>
<b>9663</b>	<b>1.0</b>	<b>162</b>	<b>MMP 1, 2, 8, 9, 12-14</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>51</b>
<b>9664</b>	<b>2.0</b>	<b>203</b>	<b>MMP 2, 3, 13</b>	<b>46</b>	<b>-9</b>	<b>28</b>

# Inhibitoru ietekme uz endotēlija šūnu kapilāru tīkla struktūru veidošanās uz matrigēla



IF: Endotēlija šūnu HUVEC-2 monoslānis, 24 st., Calcein AM (Cayman), vielu konc. 20 $\mu$ M, 80x

# Inhibitora #9626 ietekme uz asinsvadu veidošanos matrigelā *in vivo*

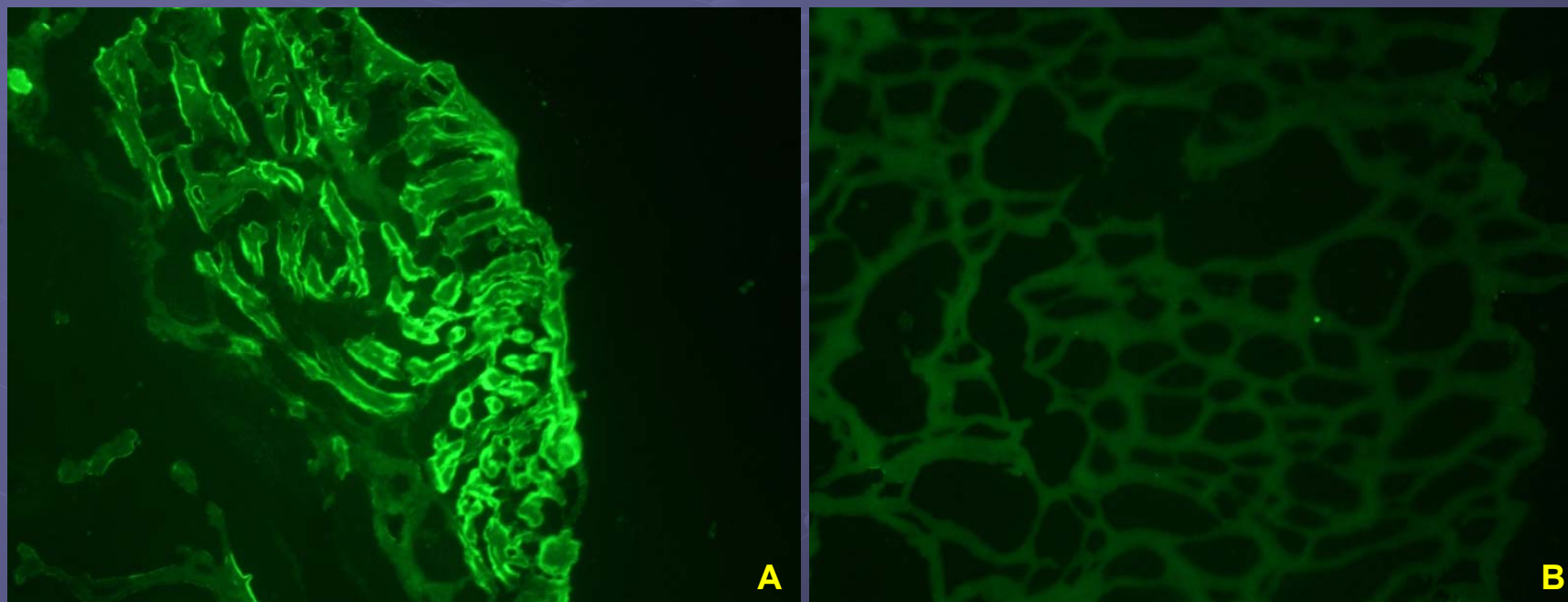


BALB/c, matrigēla (BD) griezumš, *Hematoxylin & eosin staining*, 10 d., 80x

A - kontrole

B - 9626

# Inhibitora #9626 ietekme uz asinsvadu veidošanos matrigēlā *in vivo*

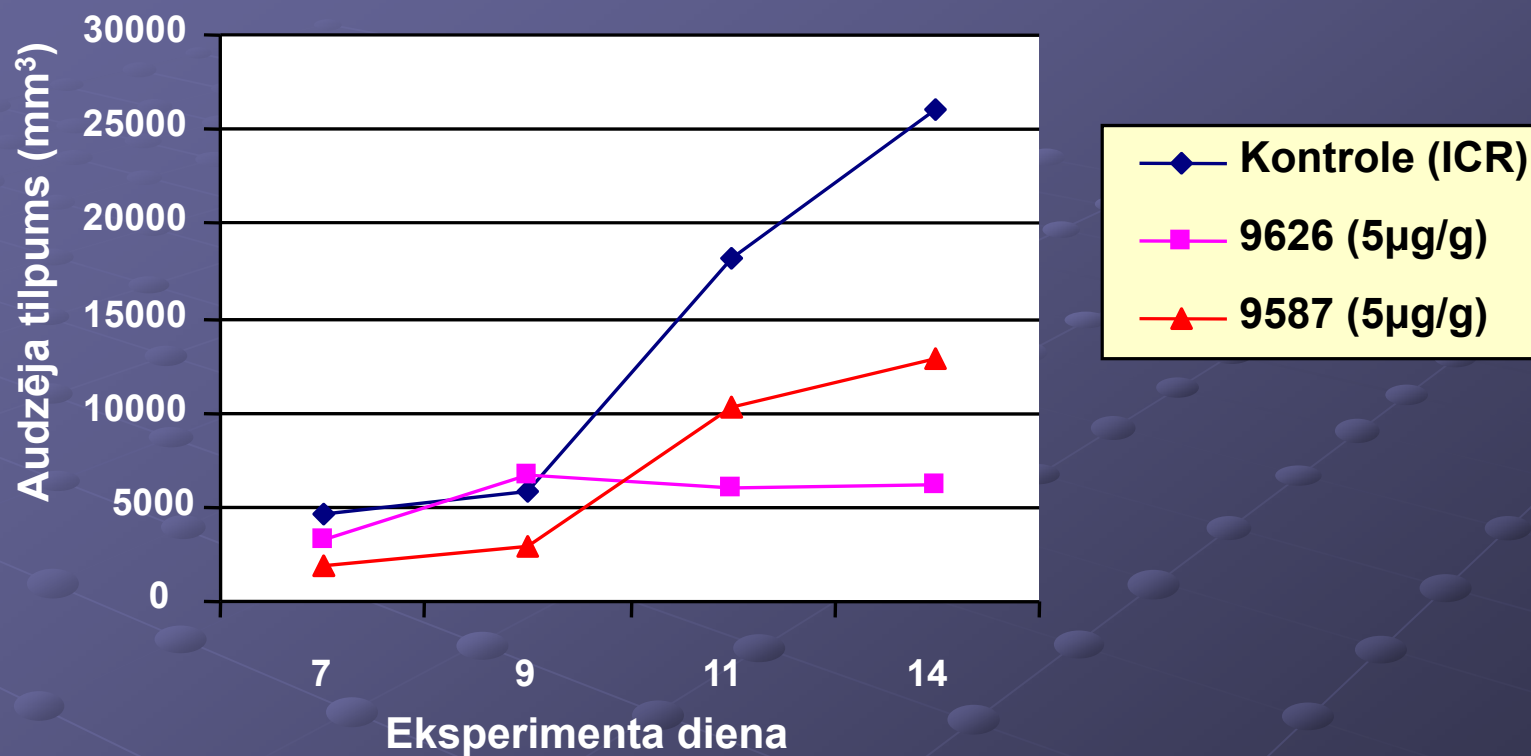


IF: BALB/c, Fluorescences intensitāte matrigēla griezumos: anti-CD31(PECAM-1)/IgG-FITC, 80x

A - kontrole

B - 9626

# Inhibitoru #9587 un #9626 ietekme uz peļu sarkomas S-180 audzēja šūnu attīstību



Vielas #	Audzēja augšanas inhibīcija, %	Audzēja asinsvadu augšanas inhibīcija, %
9587	50	42
9626	72	10

## Rezultāti

- Pārbaudīti >50 jauni ķīmiski savienojumi pēc to spējas inhibēt MMP proteāzes
- 21 jaunsintezētajam savienojumam noteikts MMP inhibitorais efekts. Tālākiem citotoksicitātes, angiogēnēzes un metastazēšanās pētījumiem atlasīti 7 perspektīvākie inhibitori
- Savienojumu #9587 un #9626 efektivitāte pārbaudīta uz ICR pelēm ar pārpotētu sarkomu S-180. Novērota audzēju augšanas inhibīcija 50 un 72% apmērā