

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 (BMC)
Irina Šestakova (OSI)

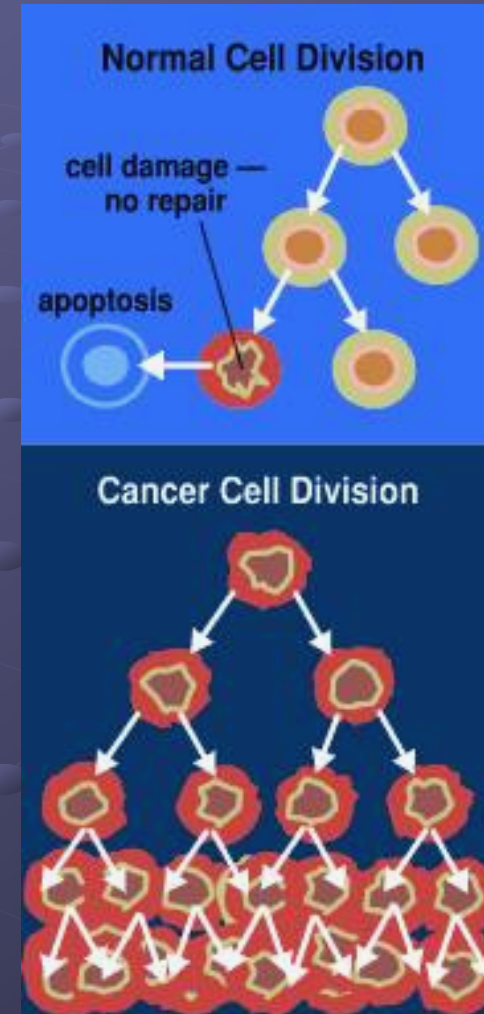
Seminārs ”Metodoloģiski pētījumi pretvēža terapijas efektivitātes paaugstināšanai”

Projekta uzdevumi:

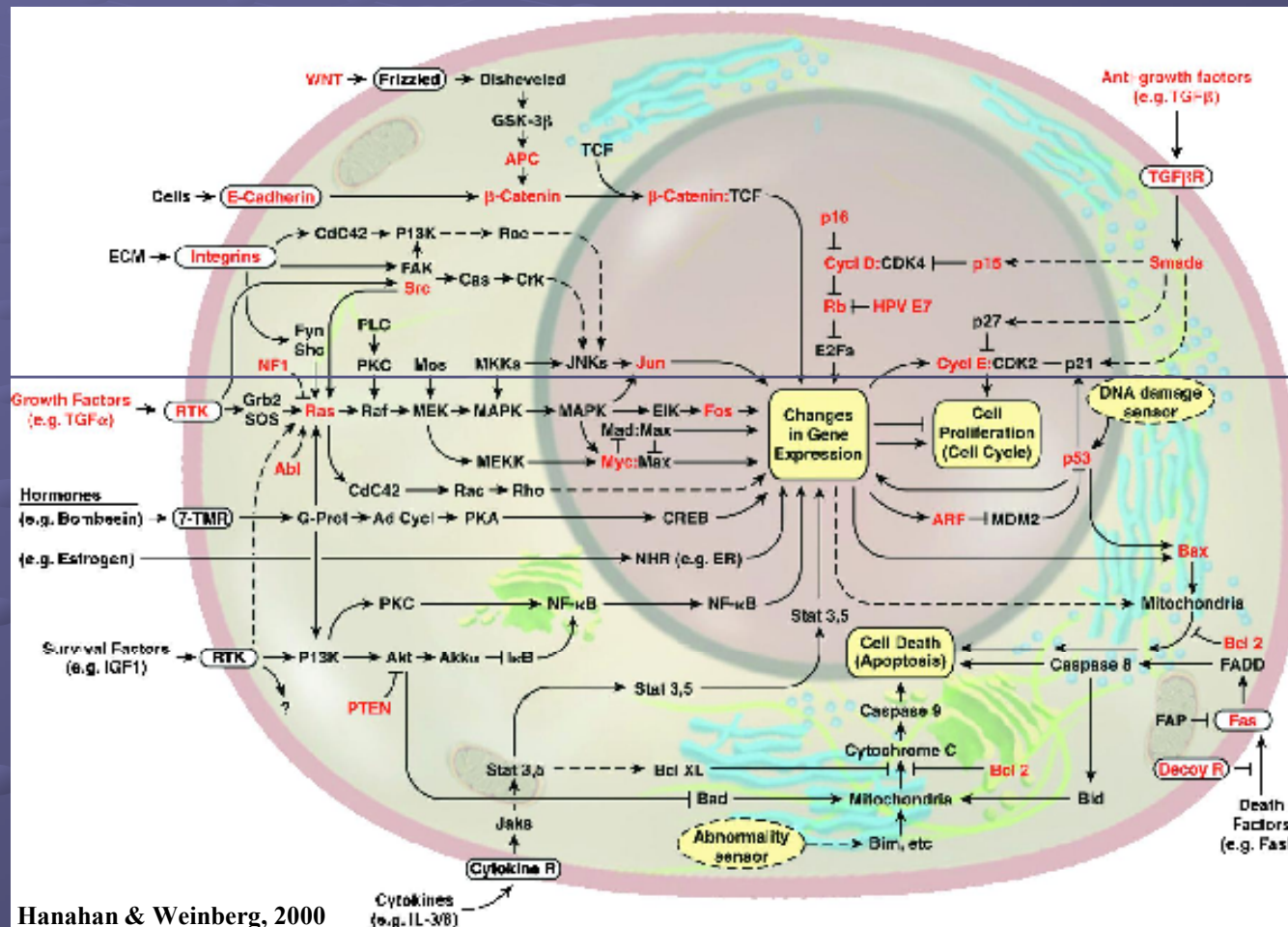
1. Jaunu pretvēža savienojumu pārbaudes un darbības mehānismu skaidrošana
2. Vēža šūnu un neoangiogēnēzes attīstības pētījumi šūnu kultūru un dzīvnieku modeļos *in vitro* un *in vivo*

Vēža šūnas attīstība

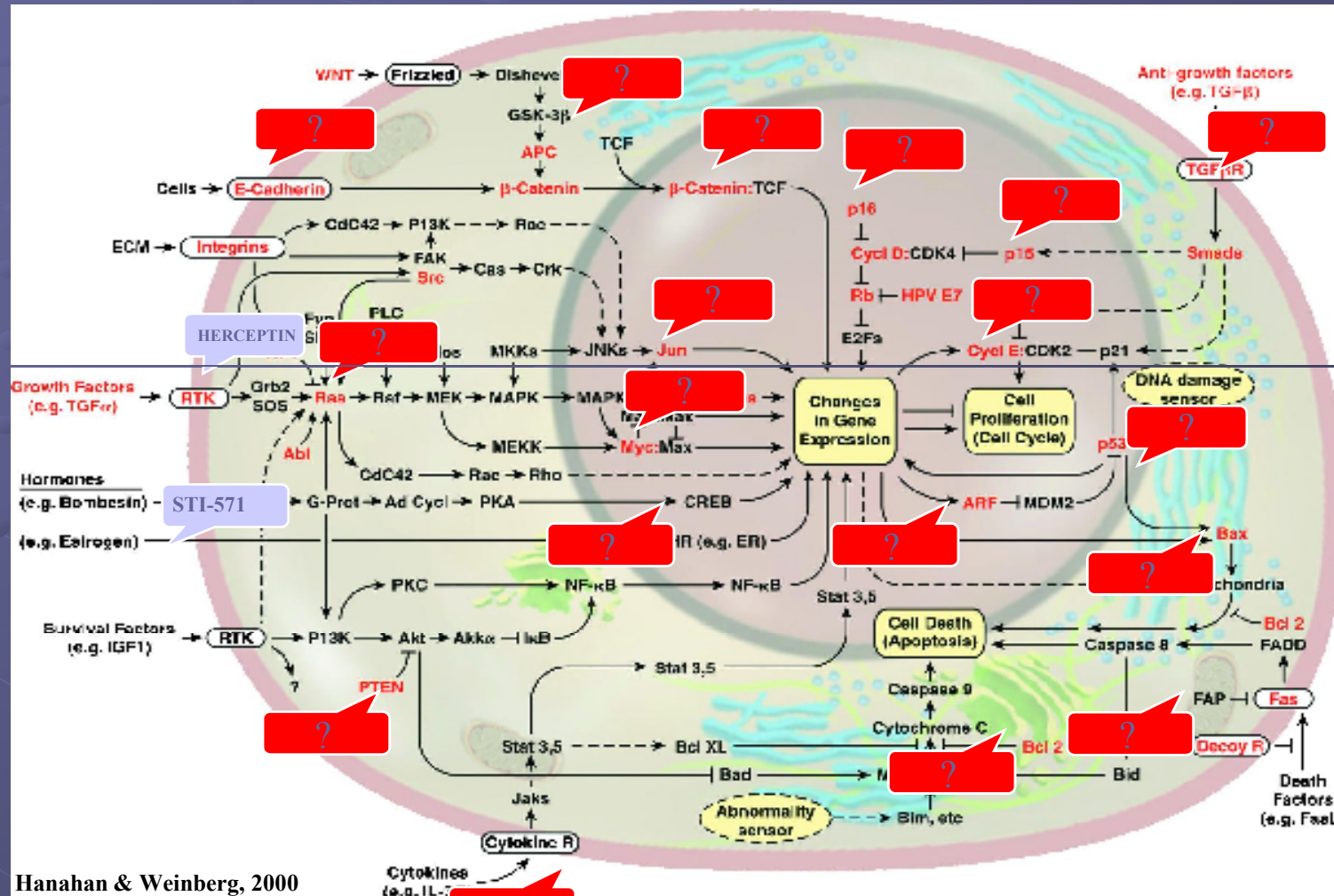
- Vēzis: slimību kopums, kuru raksturo šūnu nedabiska un nekontrolējama augšana (ģenētiska slimība)
- Vēzis rodas no normālas augšanas kontroles zuduma (normāla gēna mutācijas - onkogēni)
- Dabiski normāliem audiem jaunu šūnu veidošanās un vecu šūnu atmiršanas proporcija ir sabalansēta
- Vēzim šis līdzsvars ir izjaukts
- Līdzsvars zudums ir saistīts ar
1) nekontrolētu šūnu augšanu un
2) šūnu nejūtīgumu pret apoptozi



Pēdējo desmitgažu vēža pētījumu rezultāti

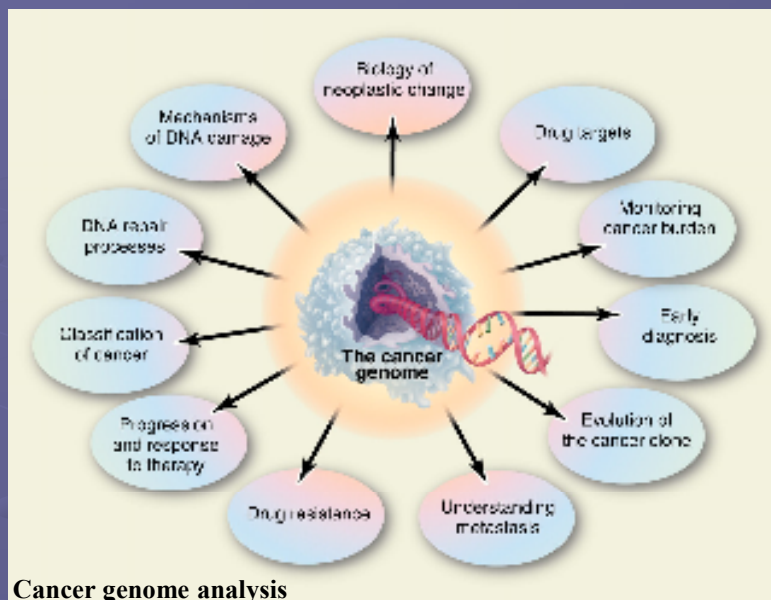


... un iespējamie risinājumi

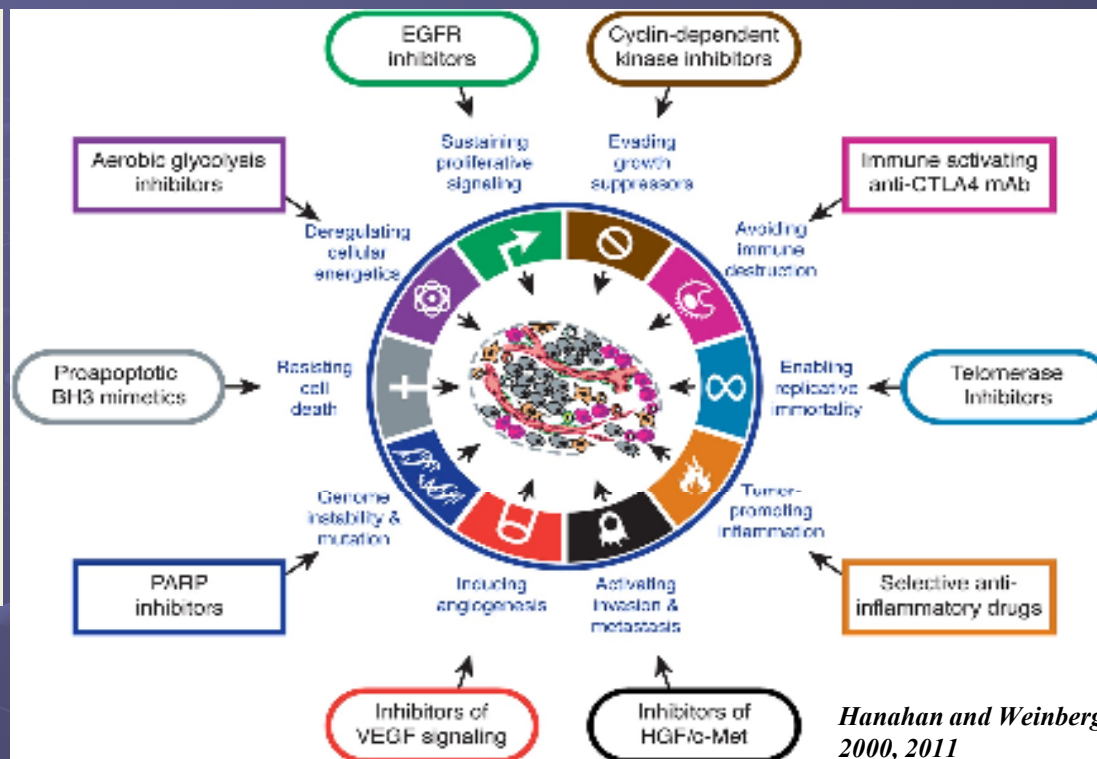


Hanahan & Weinberg, 2000

Vēža attīstības bioloģija: audzēja augšana un metastāžu veidošana



Cancer genome analysis



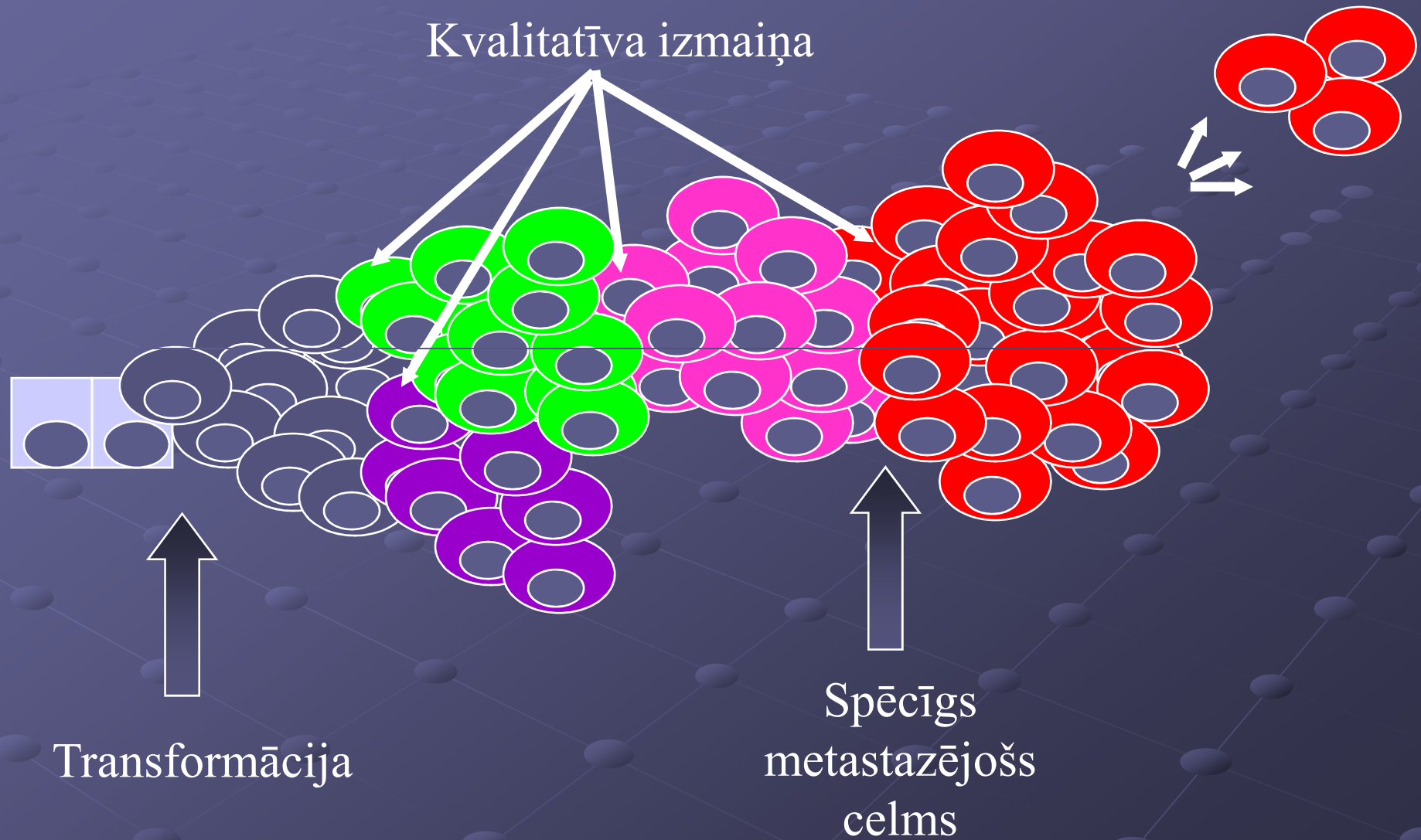
Hanahan and Weinberg, 2000, 2011

Vēža šūnas iegūtās specifiskās īpašības:

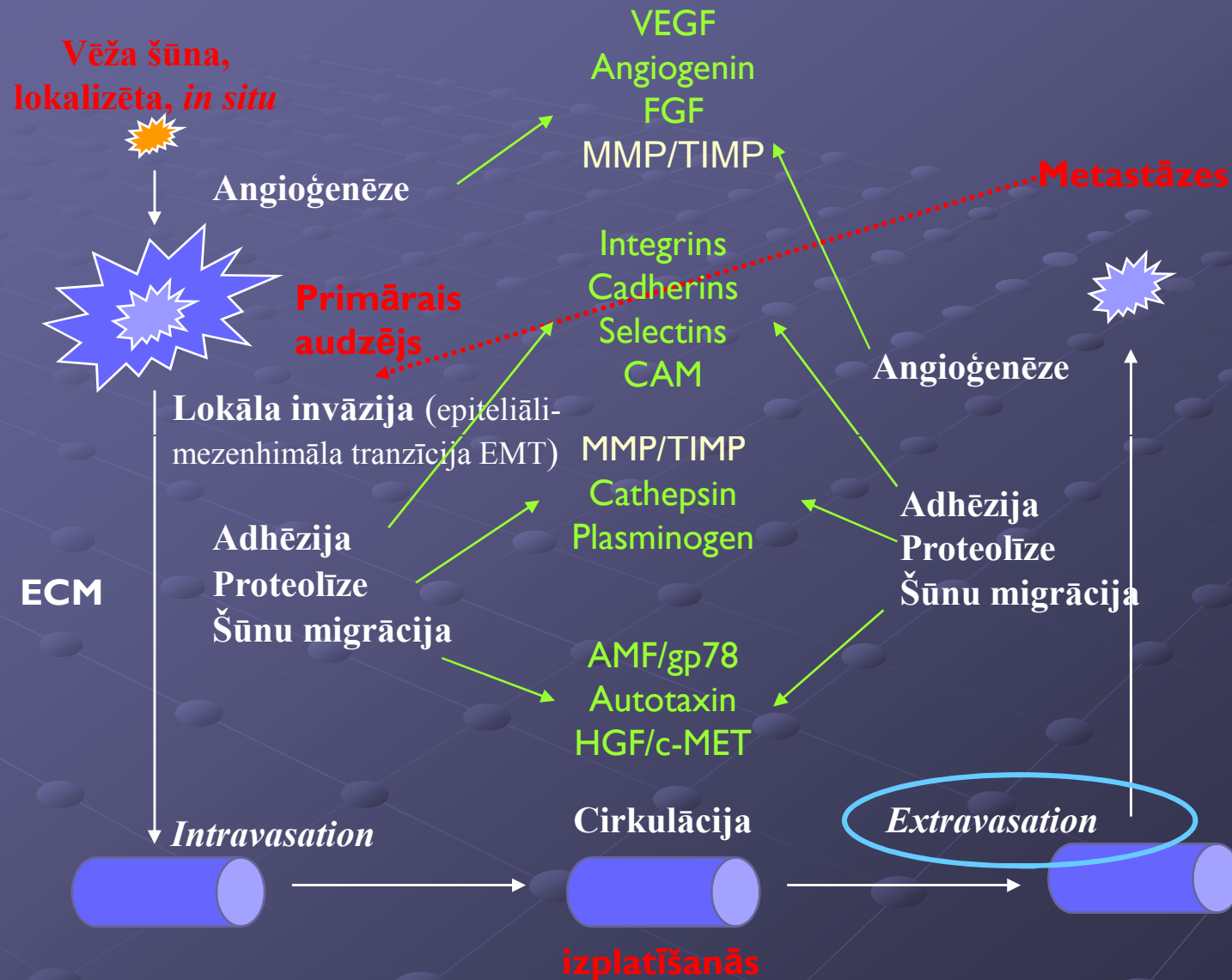
- Pašprietiekamas augšanas stimulācijā
- Nejutīgas pret augšanas faktoru inhibitoru iedarbību
- Nejutīgas pret apoptozes signāliem
- Neierobežots vairošanās potenciāls (nemirstīgas)
- Angiogēnēzes procesu veicināšana
- Invāzija dažādos audos un metastazēšana
- Genoma nestabilitāte



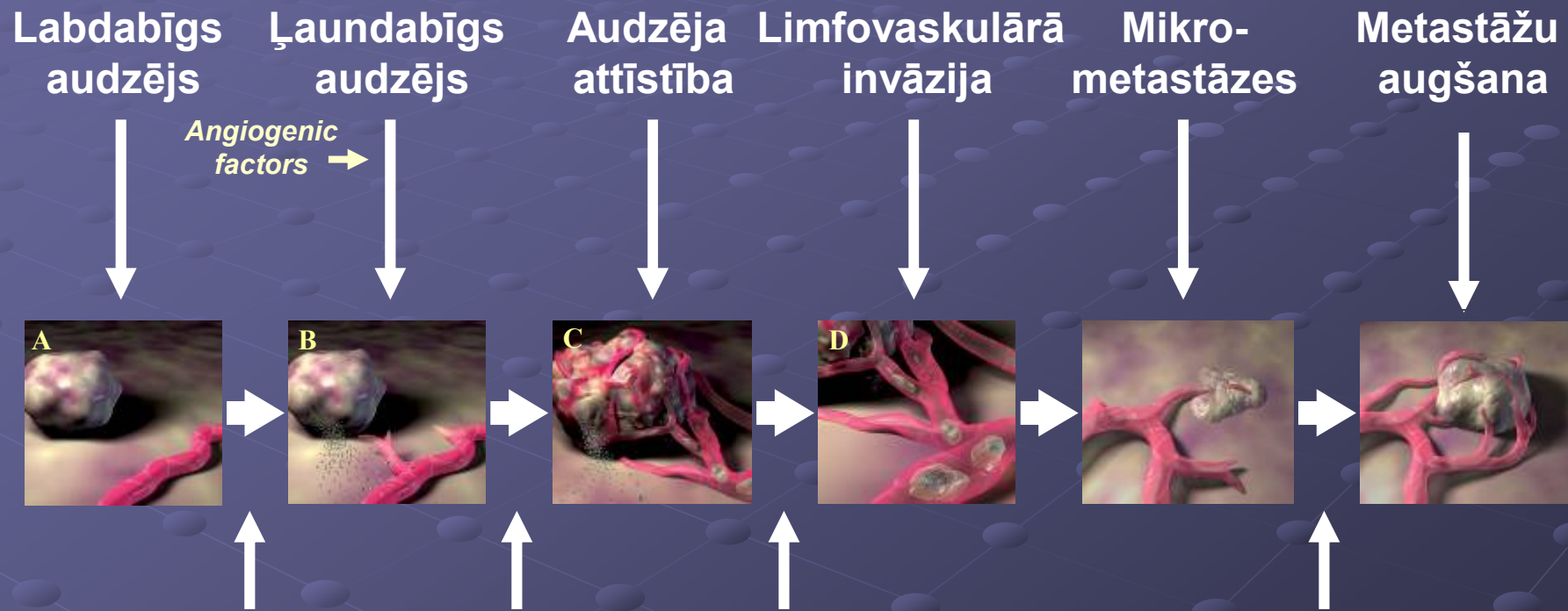
Vēža šūnu klonālā evolūcija: heterogenitāte un dominance



Metastāzes kaskāde



Angioģenēze: nepieciešama ļaundabīga audzēja augšanai un progresēšanai



Slimības progresijas posmi, kuros angioģenēzei ir nozīmīga loma audzēja attīstībā

Adapted from Poon, et al. JCO 2001

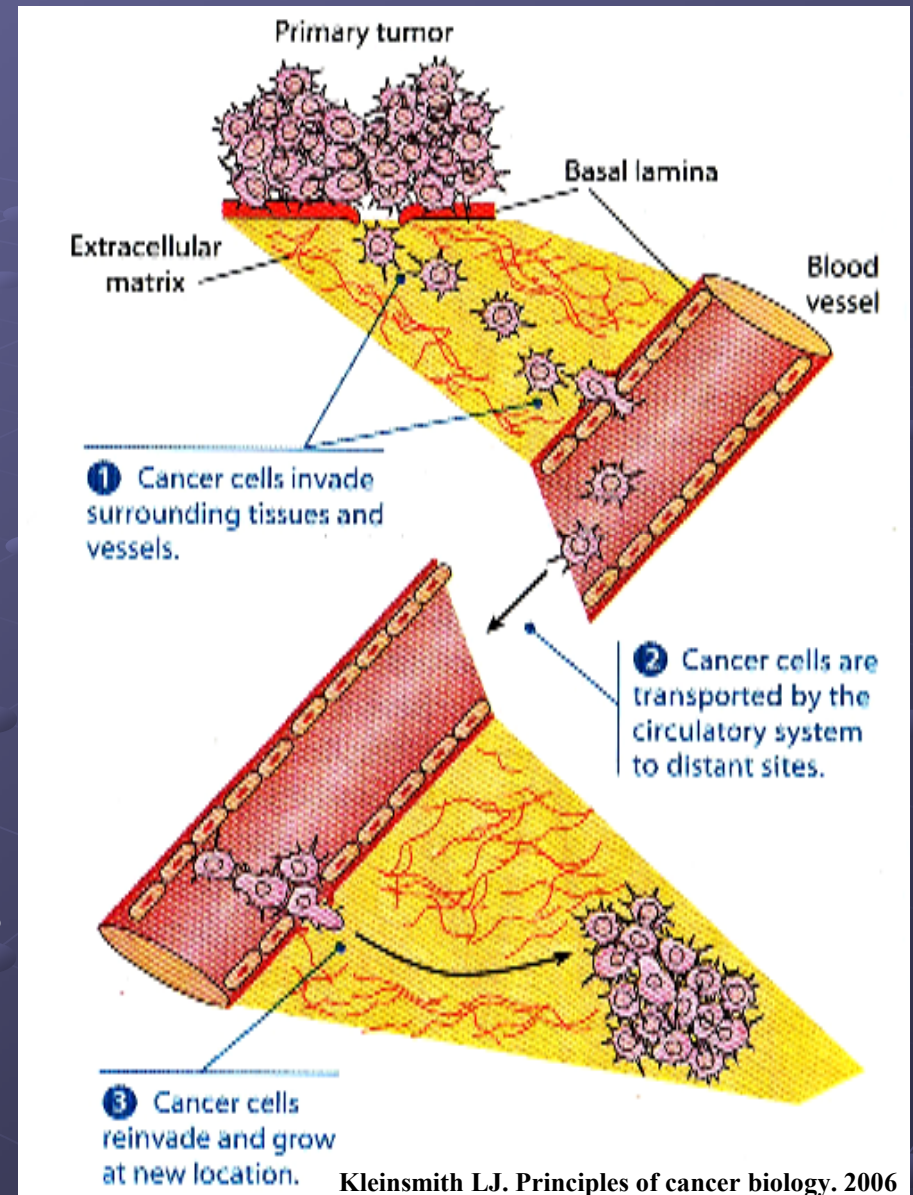
A, Audzējs 1-2 mm³ saņem skābekli un barības vielas difūzijas ceļā

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

C - D, Jauns vaskularizēts audzējs iegūst spēju augt un metastazēt

Angioģenēze un metastāzes

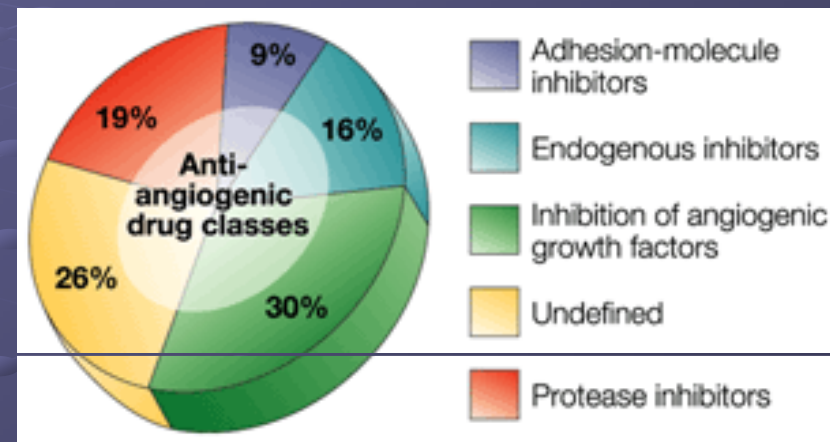
- Agrīnā audzēja attīstības stadijā, noris process angioģenēze, kad jauni asinsvadi tiek rekrutēti no blakusesošās asinsrites sistēmas
- Līdz ar asins un barības vielu piekļuvi, tiek nodrošināta audzēja masas augšana, šūnu vairošanās paātrinās un var sasniegt vairākus miljonus šūnu
- Audzēja šūnas turpina mutēt, iegūst īpašības, kas ļauj tām pārvarēt epitēlijaudu bazālo membrānu, kura normālos apstākļos veido nepārvaramu barjeru. Šādas jaunas invazīvas šūnas tagad ir spējīgas pamest audzēju. Vēža šūnas iekļūst blakusesošos audos un šķērso limfātisko un asinsvadu sienas, tādējādi iekļūstot organisma asins cirkulācijas sistēmā.
- Vēža šūnas pamet asins sistēmu un iekļūst noteiktos orgānos, kur vairojas un veido jaunus metastazējošus audzējus. Spēja veidot metastāzes arī padara vēzi par īpaši smagu slimību ar augstu letālu iznākumu. Rezultātā rodas arvien jauni audzēju perēļi (sekundāri audzēji) citos ķermeņa orgānos.



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 ECM šķelšanu, nepieciešamu jaunu asinsvadu veidošanai



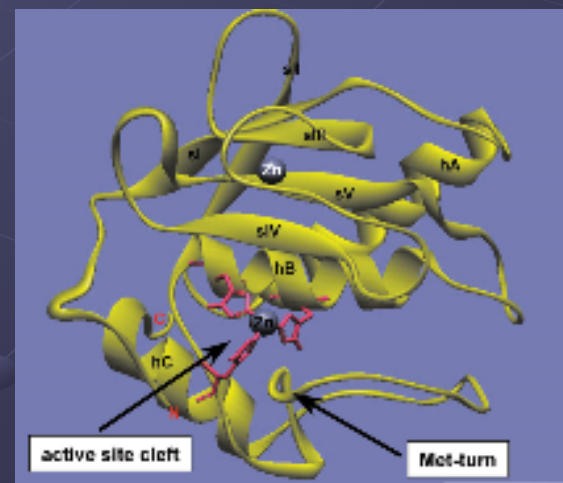
Antiangiogēnēzes zāļu mērķis:

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

Matriksa metaloproteināzes (MMP)

- MMP - cinka saturošas metalo-endo-peptidāzes (proteāžu saime)
- šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija/adhēzija, apoptoze, (in)aktivācija, angiogēnēze, imūnatbildes
- šūnā sintezētas latentā formā (neaktīvs zimogēns)
- sekretētas 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: ≥ 4 grupās atkarībā no strukturālām atšķirībām un substrāta specifiskuma
- Šķīstoša un sekretējama grupa: *collagenase*, *gelatinase*, *stromelysins*
- Membrānas tipa grupa: plazmas membrānā



Eksperimentālā pieeja I

- 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*

Eksperimentālā pieeja II

Mazmolekulāri savienojumi

Citotoksiskuma noteikšana (IC_{50})

un

Toksiskuma noteikšana (LD_{50})

HT-1080 – cilvēka fibrosarkoma

MG-22A – peļu hepatoma

3T3NIH – peļu embrionālie fibroblasti

MMP inhibīcija

Augstas caurlaidspējas skrīnings

Angioģenēzes inhibīcija *in vitro*

HUVEC2 – cilvēka endotēlijs;
Matrigels BD BiosciencesTM

Angioģenēzes inhibīcija *in vivo*

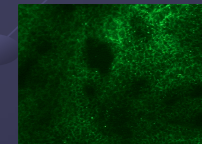
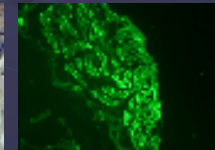
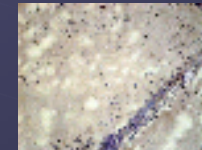
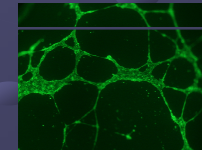
Matrigels BD BiosciencesTM;
Balb/c peles

Audzēju augšanas inhibīcija

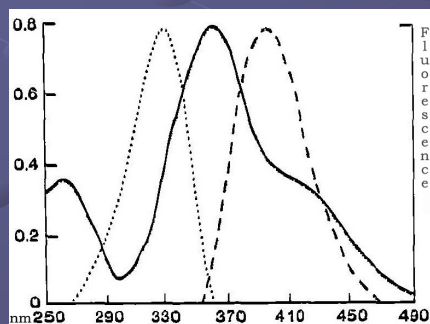
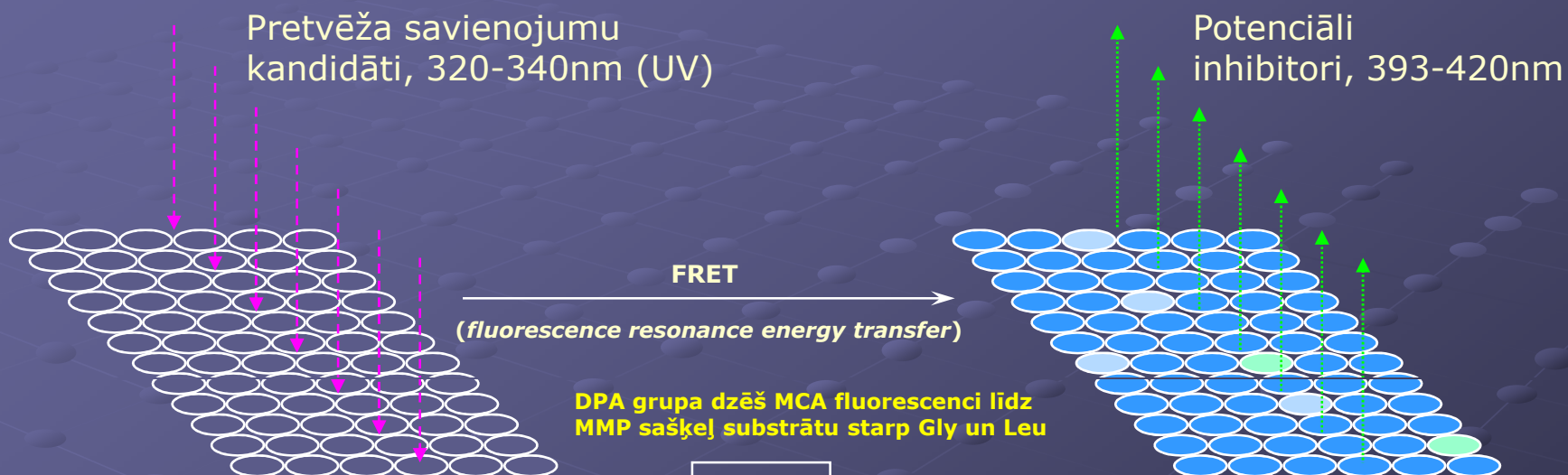
Peļu sarkoma S-180;
ICR peles

Audzēju metastāžu inhibīcija

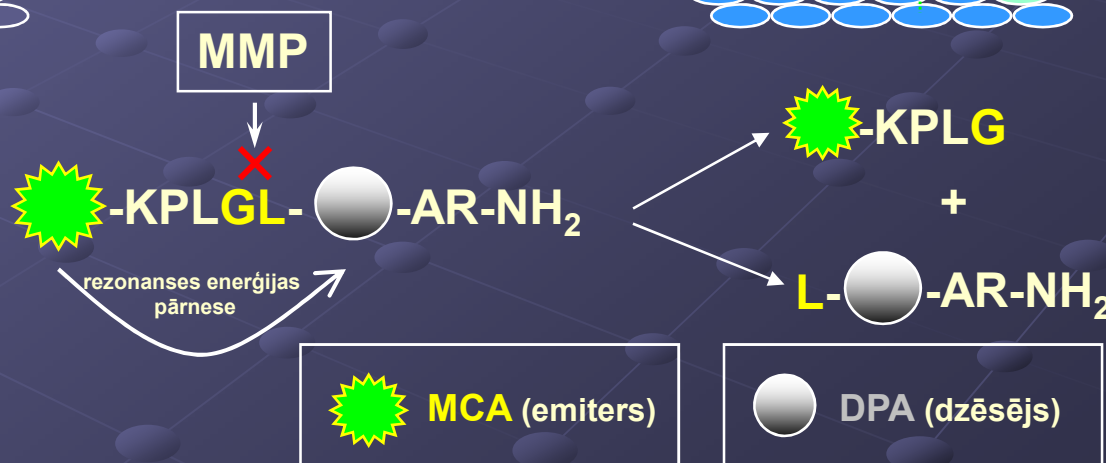
Peļu melanoma B16;
C57/BL peles



MMP inhibitoru atlase izmantojot fluorogēnu peptīda substrātu (FRET)



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



MCA-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂
DPA: N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl
MCA: (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl,

MMP aktivitāti inhibējošie savienojumi (I)

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 aktivitāti inhibējošie savienojumi (II)

Vielas, 20µM	Metalloproteāzes , izoformas (inhibīcija, %)									
	MMP 1	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8	MMP 9	MMP 10	MMP 12	MMP 13	MMP 14
PESF 1805	10.10	14.66	10.00	6.35	0.00	11.20	13.98	13.30	12.22	33.50
PESF 1809	13.58	31.91	13.37	10.70	16.92	12.69	12.81	12.22	10.57	21.56
PESF 1810	18.47	26.36	14.09	14.24	15.42	15.30	16.31	13.79	23.74	24.63
PESF 1811	12.03	54.02	15.83	12.29	12.42	16.97	12.63	14.88	14.85	39.99
PESF 1812	22.69	43.03	14.34	13.67	17.36	19.00	15.32	19.70	13.36	25.27
PESF 1813	20.77	43.97	20.81	16.52	18.41	16.53	19.18	18.62	19.39	27.55
E-110-B	25.61	0.00	21.03	18.68	27.19	24.40	17.58	20.78	21.25	20.77
E-110	14.32	0.00	13.20	7.61	9.34	19.31	13.58	16.65	11.57	11.76
E-132	10.00	0.00	7.17	5.25	2.78	14.50	9.75	9.48	14.36	6.74
J-10-14	0.00	0.00	0.00	1.12	0.00	6.89	0.00	0.00	0.00	3.96
V-3-2	6.89	0.00	2.76	5.25	0.84	11.90	8.50	9.96	7.48	9.84
E-130-1	8.79	0.00	5.17	4.65	0.00	11.70	6.91	8.99	9.23	10.84
EE-126	1.55	0.00	8.56	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PESF-1106-01	20.72	56.38	16.35	13.90	29.74	21.52	23.58	18.60	13.76	27.17
PESF-1106-02	7.58	75.16	22.08	13.51	18.25	14.69	20.56	17.05	61.11	32.74
PESF-1106-03	15.56	44.68	8.89	10.63	12.60	17.78	14.71	18.60	7.28	20.35
PESF-1106-08	4.69	60.89	5.12	3.66	24.19	5.87	6.84	8.86	13.66	21.00

Std. inh. NNGH = 100%

Inh. >25%

Inh. >40%

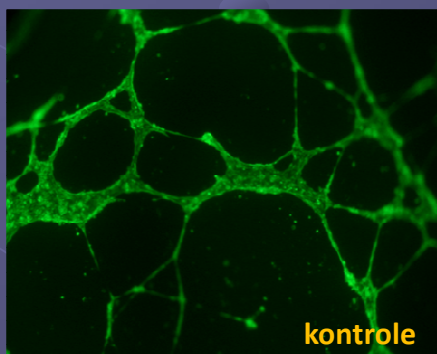
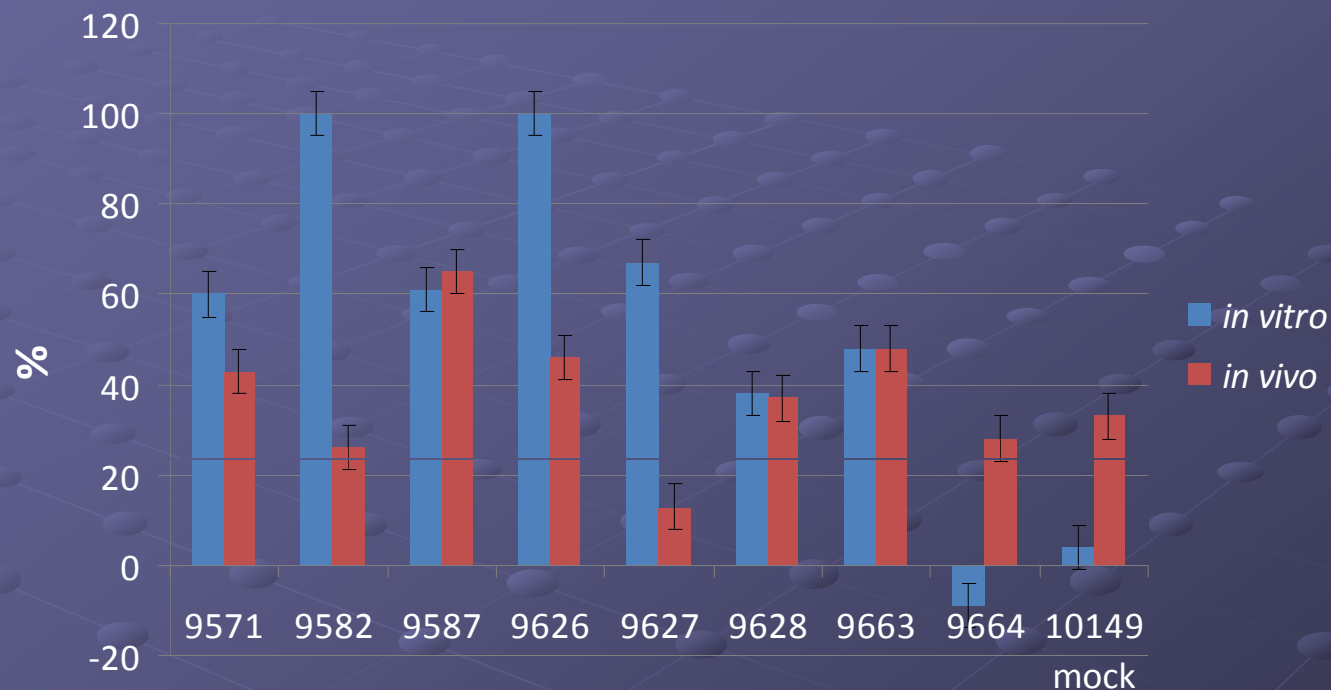
Inh. >60%

MMP inhibitoru citotoksicitātes, vielu toksiskuma un angiogēnēzes inhibīcijas pārbaude

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

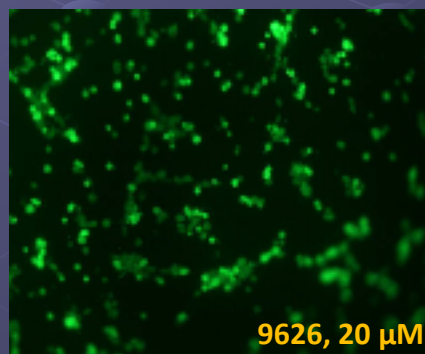
Kapilāru tīkla struktūru veidošanās inhibīcija

Angioģenēzes inhibīcija, %

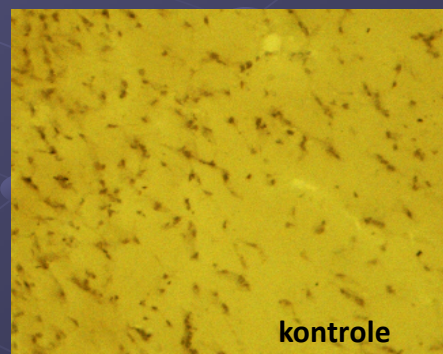


kontrolē

Kapilāru tīkla struktūras veidošanās, endotēlija šūnas HUVEC, *in vitro*, 24h

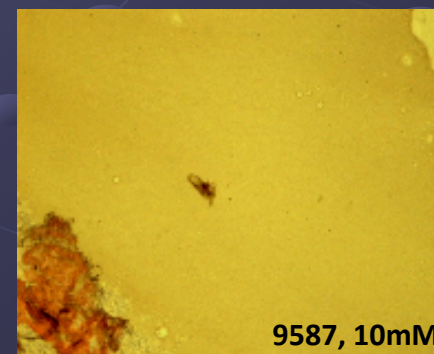


9626, 20 μM



kontrolē

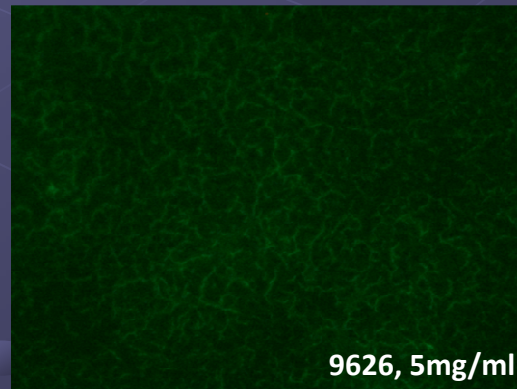
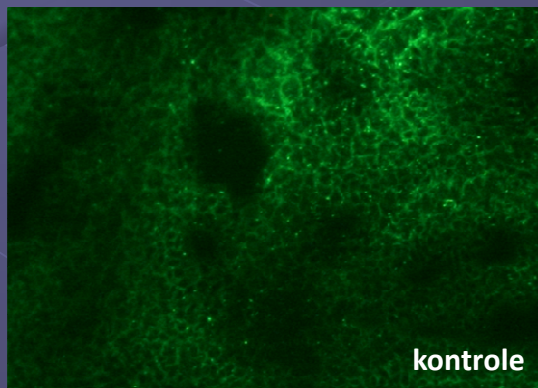
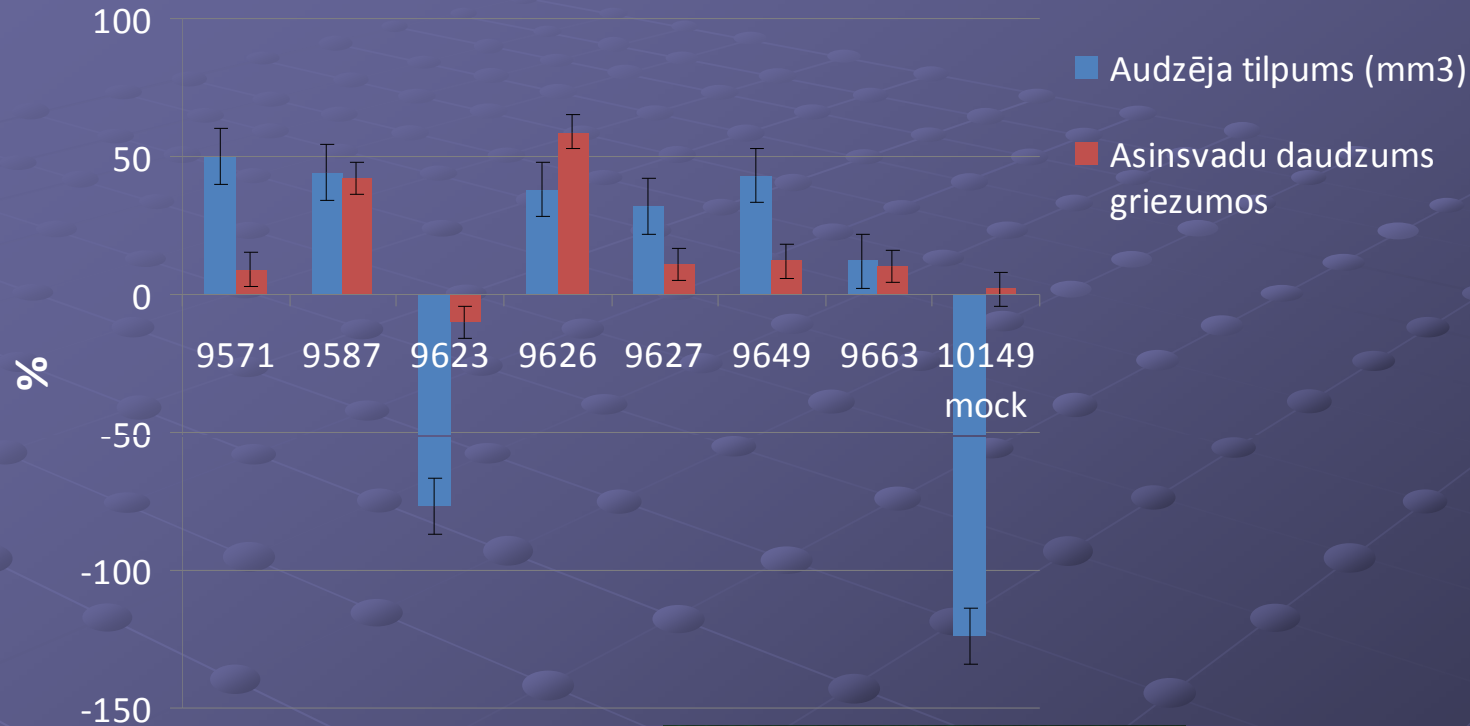
Matrigela griezumā, krāsoti ar hemotoksilīnu, *in vivo*, 10 dienas



9587, 10mM

Asinsvadu un audzēju veidošanās analīze

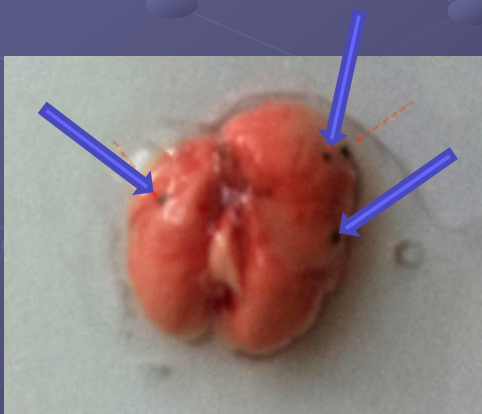
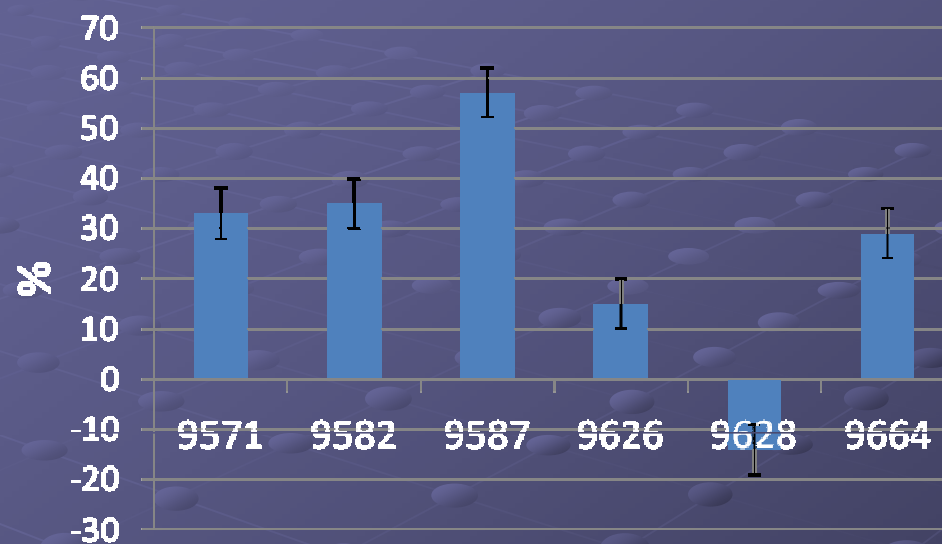
Peļu sarkomas (CCL8) augšanas un angiogēnes inhibīcija



in vivo, peļu sarkomas S-180 (CCL8) griezumumi, krāsoti ar Dextran-FITC

Metastāžu veidošanās inhibīcijas analīze

Audzēja B-16 metastāžu inhibīcija plaušās



Peļu melanomas B-16 metastāzes C57/BL plaušās, 24 dienas, kontroles grupa

Svarīgākie rezultāti

- Pārbaudīti >100 jauni ķīmiski savienojumi pēc to spējas inhibēt MMP proteāzes
- 30 jaunsintezētiem savienojumam novērots MMP inhibitorais efekts. Tālākiem angiogēnēzes un metastazēšanās pētījumiem atlasīti 10 perspektīvākie inhibitori
- Savienojumu #9587 un #9626 audzēju augšanas inhibitorās efektivitātes: 50% un 72%.
- Savienojuma #9587 metastāžu veidošanās inhibitorā efektivitāte: 57%.

Pētījuma rezultātu prezentācija

Starptautiskā farmakoloģijas konferencē „Targeting cellular regulatory systems”,
Rīga, 2012. gada 20.-21. aprīlis

Multidisciplinārā simpozijā „Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine”,
Kijeva, 2012. gada 17. – 22. septembris

New derivatives of furan and thiophene as inhibitors of MMPs and angiogenesis

A.Gulbe¹, E.Jaschenko¹, I. Shestakova¹, S.Lubina¹, A.Leonchiks², Z.Rudevica², L.Ignatovich¹

¹ Latvian Institute of Organic Synthesis, ²Latvian Biomedical Research and Study Centre