

Projekts Nr. 3

3. Jaunu pretvēža zāļu un imunoterapijas līdzekļu izstrāde

projekta vadītāja
vārds, uzvārds,
zinātniskais grāds
institūcija
ieņemamais amats
kontakti

Aija Linē	
<i>Dr. biol.</i>	
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs	
Vadošā pētniece	
<i>Tālrunis</i>	67808208
<i>E-pasts</i>	<i>aija@biomed.lu.lv</i>

1. Projekta Nr. 3 mērķi:

(Norāda projekta mērķi (saskaņā ar apstiprināto projekta pieteikumu un līgumu) un informāciju par mērķa sasniegšanu/izpildi)

Projekta mērķis ir iegūt jaunas zāļu vielas ar imūnstimulējošu un pretvēža aktivitāti, izstrādāt jaunas vēža imunoterapijas stratēģijas, kas balstītas uz imūnsupresijas mazināšanu audzēja mikrovidē, un veikt to preklīnisko izpēti. Projekta īstenošanas gaitā tika veikti pētījumi audzēju mikrovides izpētē, izstrādātas jaunas gēnu piegādes sistēmas, kā arī sintezētas jaunas zāļu vielas ar pretvēža vai imūnstimulējošu aktivitāti. Kā terapeitiskie mērķi tika izvēlētas ogļskābes anhidrāze IX, matricu metālproteāzes un 2,3-dioksogenāze. Tika veikta iegūto savienojumu testēšana *in vitro* testa sistēmās, kā arī iesākts darbs pie peļu audzēju modeļu izstrādes un terapeitisko stratēģiju pre-klīniskajiem izmēģinājumiem. Projekta īstenošanas rezultātā ir iegūtas jaunas zināšanas, kas paver iespējas tālāk attīstīt vairākas personalizētas vēža imunoterapijas stratēģijas, un iegūtas zāļu vielas, kas uzrāda pret-vēža aktivitāti. Tādējādi šis projekts sekmē programmas mērķu sasniegšanu, radot pasaules līmeņa zināšanas onkoloģisko slimību jomā.

2. Projekta Nr. 3 uzdevumi:

(Norāda projekta pārskata periodā plānotās darbības un galvenos rezultātus. Kopējais saturiskais izklāsts nepārsniedz divas A4 lapas)

Darba uzdevumi	Galvenie rezultāti
WP1:Audzēja mikrovides izpēte	
A1.2. Analizēt CAIX ekspresijas ietekmi uz imūnšūnu infiltrāciju un TLS veidošanos plaušu un krūts vēža audos; noteikt audzējā infiltrēto B šūnu antigēnu specifiskumu, to korelēt ar slimības gaitu, ārstēšanas efektivitāti un dzīvildzi; veikt gēnu ekspresijas profilu analīzi plaušu vēža recidīvos.	Pabeigts darbs pie TLS prognostiskās lomas izpētes plaušu vēža pacientiem. Noskaidroti TLS veidošanās etapi un izpētīta mikroanatomiskā niša, parādīta TLS blīvuma un funkcionālās aktivitātes saistība ar efektoro un atmiņas B un T šūnu gēnu ekspresiju un pacientu dzīvildzi. Noskaidrots, ka krūts vēža audos ar augstu CAIX ekspresiju ir būtiski samazināta efektoro B un T šūnu infiltrācija. Publikācijas manuskripts iesniegts <i>Cancer Cell</i> un rezultāti ziņoti starptautiskā konferencē.
WP2:Jaunu imūnstimulējošu un pret-vēža zāļu vielu un gēnu piegādes sistēmu dizains un sintēze	

<p>A2.1. Tiks iegūti jauni bicikliski pirazola un piridīna kumarīna rindās un tiks veikta to CA inhibitoro īpašību pārbaude.</p>	<p>Izstrādāta jauna sintēzes metode biciklisko pirazola un piridīna kumarīna analoģu sintēzei un iegūti pirmie savienojumi un veikta to CA inhibitoro īpašību pārbaude. Piridīna kumarīnu analogi uz rāda selektīvu CAIX un CAXII izoformu inhibīciju submikromolārā līmenī. Sagatavoti divi publikāciju manuskripti, kas iesniegti <i>J. Enz. Inhib. Med. Chem.</i></p>
<p>A2.2. Tiks sintezēti jauni aziridīna atvasinājumi, kuri satur lupāna rindas triterpēnus. Tiks paplašināta dabas olefīnu (kurkumīns, resveratrols u.c.) aziridinēšanas metode, izmantojot Armstronga un Kurti metodes.</p>	<p>Iegūti pirmie lupāna triterpēnu un aziridīn-2-karbonskābes atvasinājumu konjugāti. Atrasti reakciju apstākļi kā iegūt N-aizvietotus un NH aziridīn-2-karbonskābes esterus. Kurkumīna un resveratrola aziridinēšana, izmantojot Armstronga un Kurti metodes nenotiek. Tiek izstrādāta jauna modificēta olefīnu aziridinēšanas metode.</p>
<p>A2.3. Amfifīlu aizvietotāju saturošu 2-heteril-1,4-dihidropirimidīnu sintēze. 2-Heteril-1,4-dihidropirimidīnu izosteru-atbilstošu 1,4-dihidropiridīnu kā potenciālu HBV inhibitoru dizains un sintēzes metodes izstrādāšana.</p>	<p>Veikta jaunu aizvietotāju grupu saturošu heteroarildihidropirimidīnu (HAP) sintēze. Iegūto savienojumu aktivitāte tika testēta A3.4. aktivitātē. Sagatavots LR patenta pieteikums.</p>
<p>A2.4. Jaunu sintētisko katjono lipīdu uz 1,4-DHP bāzes dizains un sintēze, veicot molekulas 3,5-vietu modifikācijas. Plānots oriģinālajās, augstāko aktivitāti uzrādošajās molekulās, parasto aklilaizvietotāju vietā ievadīt sazarotus alkilaizvietotājus potenciālo transportmolekulu pētījumiem un struktūras-aktivitātes analīzei.</p>	<p>Sintezēta jauna oriģināla amfifilo nanodaļiņas veidojošo savienojumu grupa uz 1,4-DHP bāzes, ievadot molekulas 3,5-vietās sazarotus alkilaizvietotājus. Rezultāti ziņoti 4 starptautiskās konferencēs, aizstāvēti 2 maģistra darbi, sagatavoti 6 analītiskie sertifikāti. .</p>
<p>A2.5. MMP inhibitoru struktūru optimizācija un sintēze. Selenofēna-kumarīna atvasinājumu MMP inhibitorās aktivitātes pārbaudes.</p>	<p>Veikta aktīvāko selenofēnkumarīnu struktūras optimizācijas balstoties uz SAR datiem. Uz to pamata tika sintezēti 24 jauni selenofēnkumarīni un to citotoksicitāte pārbaudīta <i>in vitro</i> uz 10 šūnu līnijām. No tiem 20 savienojumu inhibējošas īpašības tika pārbaudītas uz izolētām MMP1-MMP14. Saņemts pozitīvs vērtējums starptautiska patenta pieteikumam (PCT/IB2016/05434).</p>
<p>A2.6. Jaunu 2,3-dioksigenāzes (IDO) inhibitoru dizains un sintēze.</p>	<p>Tika sintezēti: N-acilamino-akrilskābes aromatiskie esteri (8), N-acilamino-akrilskābes amīdi (5), N-aroilamino-akrilskābes esteri (11), 4,5-diaizvietotie N-acil-4-aril-3-pirolīn-2-oni (5) saskaņā ar struktūras-aktivitātes datiem.</p>
<p>WP3: Iegūto savienojumu aktivitātes testēšana <i>in vitro</i> testa sistēmās</p>	
<p>A3.1. Iegūt stabili transkripcijas peļu krūts vēža šūnu līnijas, kurās nomākta CAIX ekspresija; veikt gēnu ekspresijas profilu analīzi, lai noskaidrotu signālceļus, kurus ietekmē CAIX.</p>	<p>Veicot gēnu ekspresijas profilēšanu 3 krūts vēža šūnu līnijās, kurās nomākta CAIX ekspresija, tika parādīts, ka CAIX ietekme uz hipoksijas atbildi transkripcijas līmenī ir neliela un atšķiras katrā šūnu līnijā. MDA-MB-231 šūnās CAIX inhibīcija novērsa Stanniokalcīna-1 indukciju. Iesākts darbs pie stabili transkripcijas peļu krūts vēža šūnu iegūšanas, kurās nomākta CAIX ekspresija, izmantojot CRISPR/Cas9.</p>

	Publikācijas manuskripts iesniegts <i>Cancer Biology & Therapy</i> un aizstāvēts bakalaura darbs.
A3.2. Selenofēna-kumarīna atvasinājumu MMP inhibitorās aktivitātes pārbaudes	Tika veiktas inhibitorās aktivitātes pārbaudes 36 jaunsintezētiem savienojumiem (neskaitot struktūras atvasinājumus), izmantojot vielu fluorimetrisku FRET skrīningu, kā arī papildus vielu kolorimetrisku skrīningu. Skrīninga rezultātā atlasīti tālākiem pētījumiem savienojumi ar selektīvu MMP2 un MMP14 matricisa metaloproteināžu inhibitoro aktivitāti. Labākajiem atlasītajiem MMP inhibitoru kandidātiem veikta citotoksiskuma analīze uz 8 šūnu līnijām, pavisam analizēti 10 perspektīvākie savienojumi.
A3.3. Akrilaminoskābes analogu un selenofēna-kumarīna atvasinājumu citotoksiskā efekta (ID50) un toksiskuma (LD50) pārbaudes in vitro testa sistēmās. Labāko MMP inhibitoru pārbaude uz spēju ietekmēt angiogēzi in vitro testa sistēmā.	24 jauniem selenofēnkumarīniem noteikta spēja <i>in vitro</i> nomākt dažāda tipa vēžu šūnu augšanu (10 līnijas, karcinomas, sarkomas, hepatomas, u.c.). Noteikts, kā savienojumiem piemīt vidēja citotoksiskā aktivitāte, bet vienlaicīgi ļoti zema bazālā toksicitāte. Papildus, katrā savienojumu grupā tika konstatēti pārstāvji ar Indolildeoksigenāzes (IDO) inhibējošām īpašībām. Starp 4,5-diaizvieto-tiem N-acil-4-aryl-3-pirolīn-2-oniem tika identificēti spēcīgi IDO inhibitori (līdz pat >70%), pie tam arī ar pietiekoši augstu antiproliferatīvo aktivitāti. Pētījumu rezultātā izmantojot standarta <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> angiogēzes procesa novērošanas metodes noskaidrots, kā četriem selenofēnkumarīnu atvasinājumiem piemīt izteiktās MMP inhibējošās īpašības, kaut gan šie savienojumi neparādīja izteiktu ietekmi uz angiogēzes procesu <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> .
A3.4. Jauno OSI sintezēto hepatīta B kapsīdas proteīna pašasociācijas (self-assembly) inhibitoru izvērtēšana.	Tika pētīta jaunu OSI sintezētu HBV kapsīda veidošanās inhibitora BAY 41-4109 analogu efektivitāte zīdītāju šūnās. Ir pārbaudīta Bay-41-4109 un tā analogu citotoksicitāte šūnās un salīdzināta inhibitoru ietekme uz HBc proteīna ekspresiju un nukleokapsīdu veidošanos šūnās. Sagatavota metodika hepatīta B vīrusa kapsīdas proteīna pašasociācijas (<i>self-assembly</i>) inhibitoru izvērtēšanai. Rezultāti iekļauti rakstā, kas publicēts <i>Intervirology</i> , prezentēti starptautiskā konferencē un aizstāvēts bakalaura darbs.
A3.6. Turpināt noteikt dsRNS ietekmi uz perifēro asiņu mononukleārajām šūnām, analizējot dsRNS inducēto citokīnu spektru un inducēto šūnu fenotipu. Analizēt dsRNS pastarpināto ietekmi uz audzēja šūnām, kas tiek realizēta caur imūnšūnu darbību, veidojot audzēja un mononukleāro šūnu ko-kultūras, kā arī uzsākt piloteksperimentus peļu melanomas modelī.	Noteikta dsRNS ietekme uz perifēro asiņu mononukleārajām šūnām attiecībā uz inducēto šūnu fenotipu un citokīniem. Izanalizēta dsRNS tiešā un pastarpinātā ietekme uz audzēja šūnām. Izstrādāts protokols un apzināta materiāli tehniskā bāze eksperimentiem ar dzīvniekiem. Publikācijas manuskripts iesniegts <i>Immunologic Research</i> , rezultāti ziņoti konferencē un aizstāvēts bakalaura darbs.

WP4: Iegūto savienojumu testēšana <i>in vivo</i> un imunoterapijas stratēģiju preklīniskie izmēģinājumi	
A4.2. Perspektīvāko akrilaminoskābes un selenofēna-kumarīna atvasinājumu <i>in vivo</i> testēšana uz spēju inhibēt angiogēzi peļēs ar trepsplantēto audzēju un matrigēla implantu.	Četriem selenofēnkumarīnu atvasinājumiem ar pozitīvām MMP inhibējošām īpašībām, izmantojot standarta <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> angiogēzes procesa novērošanas metodes, tika realizēti attiecīgi testi. Iegūtie struktūras-aktivitātes dati tiks izmantoti nākamajos projekta posmos angiogēzes stimulējošo vielu noteikšanai.
A4.3. Alfavīrusu vektoru un to liposomālo savienojumu bioizpaltības izpēte un terapeitisko efektu novērtēšana peļu audzēju modeļos	Izpētīta alfavīrusu daļiņu un liposomālo RNS piegādes sistēmu efektivitāte audzēju modeļos <i>in vivo</i> . Publikācijas manuskripts iesniegts <i>Journal of Virology Methods</i> , rezultāti atspoguļoti J. Vasiļevskas promocijas darbā un aizstāvēts maģistra darbs.

3. Projekta Nr. 3 izvirzīto uzdevumu izpildes rezultāti

(Novērtē, kādā mērā ir sasniegti plānotie mērķi un uzdevumi. Raksturo rezultātu zinātnisko un praktisko nozīmību, kā arī rezultātu praktisko lietojumu (lietišķiem pētījumiem). Raksturo problēmas, to iespējamās risinājumus, turpmākā darba virzienus. Kopējais saturiskais izklāsts nepārsniedz četras A4 lapas)

WP1:Audzēja mikrovides izpēte

A1.2. Mikrovides imūnā konteksta izpēte (Dr. Siliņa/Dr. Linē; BMC)

Sadarbībā ar Cīrihes Universitātes Eksperimentālās Imunoloģijas Institutu un RAKUS Patoloģijas centru, tika pabeigts darbs pie terciāro limfoīdo struktūru (TLS) prognostiskās lomas izpētes plaušu vēža pacientiem. Šajā pētījumā tika noskaidrots, kādi šūnu tipi un signāli ir iesaistīti TLS veidošanās procesā un parādīts, ka TLS blīvums audzēja audos un to aktivācija ir visnozīmīgākais neatkarīgais prognostiskais faktors plaušu vēža pacientiem. Tika atrasta saistība starp TLS blīvumu un efektoro imūnšūnu gēnu ekspresijas līmeni audos, kā arī parādīts, ka pacientiem, kas saņēmuši neoadjuvantu ķīmijterapiju, ir traucēta TLS nobriešana. Iegūtie rezultāti apstiprina hipotēzi, ka šajās struktūrās notiek efektoro imūnšūnu aktivācija un tie var kalpot par pamatu principiāli jaunas vēža terapijas stratēģijas izstrādei, kas balstīta uz TLS veidošanās stimulāciju audzēja mikrovidē. Šajā pārskata periodā iepriekš sagatavotā publikācija tika rediģēta, papildināta ar jauniem datiem un iesniegta *Cancer Cell*.

Lai noskaidrotu vai augsta CAIX ekspresija un tās izraisītā ekstracelulārā acidoze ietekmē efektoro imūnšūnu infiltrāciju, TLS veidošanos un/vai funkcionālo fenotipu krūts vēža audos, tika veiktas imunofluorescences analīzes trīskārši negatīvā krūts vēža (TNBC) audu paraugos. Sākotnējā analīze 20 pacientu paraugos pārlicinoši rāda, ka audzēju reģionos ar augstu CAIX ekspresiju ir ievērojami samazināta CD8+/Granzymeβ+ T šūnu un CD20+/CD27+ B šūnu infiltrācija. Tas ļauj izvirzīt hipotēzi, ka CAIX inhibīcija varētu normalizēt audzēja mikrovidi un uzlabot vēža imunoterapijas efektivitāti, ko paredzēts noskaidrot aktivitātes A4.1 ietvaros nākamajā gadā. Tomēr līdz šim nav skaidrs, vai šo efektu izraisa ar CAIX saistīta acidoze vai hipoksiska vide. Lai to noskaidrotu, iesākta virkne eksperimentu, kas balstīti uz audzēja un imūnšūnu ko-kultūrām. Rezultāti ziņoti starptautiskā Vēža imunoloģijas un imūnterapijas konferencē Atēnās, kur šis ziņojums saņēma balvu kā labākais stenda ziņojums.

WP2:Jaunu imunostimulējošu un pret-vēža zāļu vielu un gēnu piegādes sistēmu dizains un sintēze

A2.1. CA inhibitoru struktūru optimizācija un sintēze (Dr. Trapencieris; OSI)

Šajā pārskata periodā tika izstrādāta jauna sintēzes metode biciklisko pirazola kumarīna analogu, kā arī biciklisko un triciklisko piridīna kumarīna analogu inhibitoru sintēzei un iegūti pirmie

savienojumi, kā arī veikta to CA inhibitoru īpašību pārbaude. Gan bicikliskie, gan tricikliskie piridīna kumarīnu analogi uzrāda selektīvu CAIX un CAXII izoformu inhibīciju submikromolārā līmenī, bet attiecīgie 5-locekļu heterocikli - pirazola kumarīnu analogi pretēji attiecīgajiem agrāk sintezētajiem tiofēna kumarīnu analogiem neuzrādīja CA inhibējošas īpašības. Par šo tēmu sagatavotas divas publikācijas, kas iesniegtas *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*

A2.2. Jaunu leakadīna atvasinājumu dizains un sintēze (Dr. Trapencieris; OSI)

Tika iegūti pirmie lupāna triterpēnu un aziridīn-2-karbonskābes atvasinājumu konjugāti. Atrasti reakciju apstākļi kā iegūt N-aizvietotus un NH aziridīn-2-karbonskābes esterus. Tiek izstrādāta jauna modificēta olefīnu aziridīnēšanas metode paplašinot dabas olefīnu piemēru klāstu (kurkumīns un resveratrols) un izmantojot līdzšinējās olefīnu aziridīnēšanas (Armstronga un Kurti) metodes, kas nedeva vēlamos rezultātus. Darbā ar resveratrolu tika izmēģinātas arī vairākas fenolu hidroksilgrupu aizsarggrupas (metoksi, trimetilsilil un trietilsilil- grupas), kas rezultātā padarīja savienojumus vēl mazāk reaģētspējīgus. Turpmākā darba virziens būs modificēt Armstronga metodi (jāizmanto jauni aminējošie aģenti vai jaunas bāzes, kas reakcijas gaitā dotu reaģētspējīgākus amīnimīdus) vai Kurti metodi (jāizmanto citi pārejas metālu katalizatori). Darbā ar modeļvielām tika noskaidrots, ka olefīni aziridīnējas, ja tie saistīti ar ketogrupām vai aril atvasinājumiem, bet nenotiek ar amīdiem vai metilesteriem. Dažos gadījumos reakcijās izdodas iesaistīt t-butilesterus.

A2.3. HBV inhibitoru dizains un sintēze (Dr. Duburs; OSI)

Šajā pārskata periodā tika turpināts darbs pie mazmolekulāru HBc pašasociācijas inhibitoru (deregulātoru) racionālā dizaina un sintēzes. Tika veikta sekojošu jaunu aizvietotāju grupu saturošu heteroarildihidropirimidīnu (HAP) sintēze:

1. sintezēti jauni heterildihidropirimidīni, modificējot 5. vietas ēsteru un 4. vietas aizvietotājus;
2. iegūti jauni heteril- un aril grupu saturoši 5-karbamoidihidropirimidīna atvasinājumi;
3. veiktas 1,4 –dihidropirimidīn-5-karbonskābes alkilēšanas reakcijas, iegūstot jauna tipa kapsīdu struktūras deregulatorus ar dikarbonskābju aizvietotājiem.

Veicot literatūras izpēti, ir izstrādātas sintēzes shēmas 2-heterildihidropirimidīnu izosteru - heterildihidropirimidīnu iegūšanai.

Par iegūtajiem savienojumiem ir sagatavots LR patenta iesniegums.

A2.4. Sintētisko lipīdu tipa amfifilās pleiotropās transporta sistēmas terapeitisko gēnu piegādei (Dr. Plotniece; OSI)

Atskaites periodā, īstenojot plānotās aktivitātes, izpildīti visi izvirzītie izdevumi. Sintezētas nekomerciālas izejvielas un izveidota jauna oriģināla amfifilo nanodaļiņas veidojošo savienojumu grupa uz 1,4-DHP bāzes, ievēdot 1,4-DHP ciklā sazarotus alkilaizvietotājus. Veikts savienojumu fizikāli-ķīmisko parametru raksturojums. Perspektīvā plānots veikt jaunsintezēto savienojumu bioloģiskās aktivitātes un pašasociējošos īpašību pārbaudi. Izveidoti 6 jaunsintezēto savienojumu analītiskie sertifikāti.

Iegūtajiem datiem ir gan praktiskā, gan zinātniskā nozīmība, ko apliecina interese par rezultātiem prezentējot tos starptautiskās konferencēs un diskutējot ar nozares vadošajiem speciālistiem.

Rezultāti atspoguļoti un izcili novērtēti studentu zinātniskajos darbos – ir aizstāvēti divi maģistra darbi un rezultāti ir ziņoti četrās starptautiskās konferencēs.

A2.5. MMP inhibitoru struktūru optimizācija un sintēze (Dr. Veinbergs; OSI)

Veikta aktīvāko selenofēnkumarīnu struktūras optimizācijas balstoties uz SAR datiem. Uz to pamata tika sintezēti 24 jauni selenofēnkumarīni un to citotoksicitāte pārbaudīta *in vitro* uz 10 šūnu līnijām. No tiem 20 savienojumu inhibējošas īpašības tika pārbaudītas uz izolētām MMP1-MMP14. Savienojumu aktivitāte *in vitro* tika testēta aktivitātes A3.2. ietvaros. Saņemts pozitīvs vērtējums (12-09-2016) starptautiska patenta pieteikumam.

A2.6. JaunuIDO inhibitoru dizains un sintēze (Dr. Veinbergs; OSI)

Sintezēti: N-acilamino-akrilskābes aromatiskie esteri (8 savienojumi), N-acilamino-akrilskābes amīdi (5 savienojumi), N-aroilamino-akrilskābes esteri (11 savienojumi), 4,5-diaizvietotie N-acil-4-aril-3-pirolīn-2-oni (5 savienojumi). Katrā savienojumu grupā tika konstatēti pārstāvji ar

Indolildeoksigenāzes (IDO) inhibējošām īpašībām. Starp 4,5-diaizvieta-tiem N-acil-4-aril-3-pirolīn-2-oniem tika identificēti savienojumi ar >70% IDO inhibējošām īpašībām.

WP3: Iegūto savienojumu aktivitātes testēšana *in vitro* testa sistēmās

A3.1. CA inhibīcijas testēšana 3D šūnu kultūrās (Dr. Linē; BMC)

Lai noskaidrotu mehānismu, ar kura palīdzību CAIX inhibīcija ietekmē krūts vēža šūnu adaptāciju hipoksijas apstākļiem, tika veikta gēnu ekspresijas profilēšana 3 krūts vēža šūnu līnijās, kurās ar shRNS nomākta CAIX ekspresija. Iegūtie rezultāti parādīja, ka CAIX ietekme uz hipoksijas atbildi transkripcijas līmenī ir salīdzinoši neliela. Tomēr katrā šūnu līnijā tika atrasti vairāki gēni, kuru ekspresija ir atkarīga no CAIX. MDA-MB-231 šūnās CAIX nomākšana pilnībā bloķēja Stanniokalcīna-1 (STC1) indukciju hipoksijas apstākļos. Turklāt, šāds pat efekts tika novērts farmakoloģiski inhibējot CA ar acetazolamīdu, kas parāda, ka šis regulācijas mehānisms ir saistīts ar CA enzimatisko aktivitāti. STC1 ir sekretēts glikoproteīns, kas veicina krūts vēža šūnu invazīvātāti un audzēja progresiju. Šie rezultāti vismaz daļēji izskaidro to, kādēļ CAIX inhibīcija samazina invazīvātāti un 3D sfēroīdu veidošanas potenciālu MDA-MB-231 šūnās, ko mēs parādījām iepriekšējos pētījumos. Ir iesākts darbs pie ortotopiska peļu krūts vēža modeļa izveides, kurā, izmantojot CRISPR/Cas9 ir izslēgta CAIX ekspresija. To paredzēts izmantot, lai pētītu CAIX ietekmi uz dažādu imūnšūnu infiltrāciju un funkcionālo aktivitāti.

Par šo tēmu ir sagatavota publikācija, kas iesniegta *Cancer Biology & Therapy* un aizstāvēts bakalaura darbs.

A3.2. Selenofēna-kumarīna atvasinājumu MMP inhibitorās aktivitātes pārbaudes (Dr. Leončiks; BMC)

Šūnu matricisa metaloproteināzes (MMP) spēlē svarīgu lomu audzēju šūnu invāzijas un metastazēšanās procesos. Lai pārbaudītu jaunsintezēto kumarīna atvasinājumu un to analogu ietekmi uz metaloproteināžu izoformu MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9,-10,-12,-13,-14 enzimatiskās aktivitātes inhibēšanas spējām, tika veikta pretvēža kandidātu vielu fluorescences skrīninga analīze izmantojot EDANS/DABCYL FRET substrātu, kā arī papildus kolorimetriska analīze problemātiskākajiem savienojumiem, izmantojot citu substrātu, kas satur *thiopeptolide* grupu. Analīzes rezultātā tika atlasītas sešas jaunas vielas (PPA sērija) ar augstu specifisku MMP2 un MMP14 inhibitoro aktivitāti (>30%), kā arī vairāki savienojumi ar plašu MMP izoformu inhibitoro aktivitāti (līdz 57%). Visi perspektīvākie inhibitori tālāk tika testēti, lai *in vitro* noskaidrotu to citotoksiskuma līmeni IC₅₀, izmantojot septiņas dažādas cilvēka un peļu ļaundabīgo šūnu līnijas, kā arī normālu fibroblastu šūnu kultūru. Maztoksiskajiem savienojumiem 50% šūnu bojāeja tika konstatēta pie inhibitora koncentrācijas zemākas par 0.5 μM, savukārt toksiskākie no testētajiem savienojumiem demonstrēja 2mM vai augstāku šūnu citotoksisko aktivitāti (MTT tests).

A3.3. Selenofēna-kumarīna atvasinājumu (MMP inhibitori) un akrilaminoskābes analogu (IDO inhibitori) bioloģiskās aktivitātes pārbaudes *in vitro* testa sistēmās. (Dr. Dmračeva/Dr. Veinbergs; OSI)

Noteikta selenofēnkumarīnu atvasinājumu citotoksiskā aktivitāte uz 11 audzēju šūnu līnijām, ieskaitot MCF-7 – cilvēka krūts adenokarcinoma.

Jaunsintezētie akrilaminoskābes analogiem, ar augstu indolamīna-2,3-oksigenāzes (IDO) inhibējošo aktivitāti tika konstatēta antiproliferējoša aktivitāte attiecībā pret cilvēka fibrosarkomas (HT-1080) vēža šūnām *in vitro* un pārpotēto krūts vēža 4T1 audzēju *in vivo*.

A3.4. Aknu vēža un hepatocelulārās karcinomas rašanās riska novēršana ar principiāli jaunu pretvīrusu terapijas pieeju palīdzību (Dr. Kozlovska; BMC)

Šajā posmā tika pētīta jaunu OSI sintezētu HBV kapsīda veidošanās inhibitora BAY 41-4109 analogu efektivitāte zīdītāju šūnās. Šajā darbā HBV kapsīdas proteīna (HBc) sintēze BHK-21 šūnās tika nodrošināta, izmantojot rekombinantu alfavīrusa replikonu. Ir pārbaudīta Bay-41-4109 un tā analogu citotoksicitāte šūnās, izvērtējot šūnu morfoloģiju un aktivitāti ar MTT testu. Tika pierādīts, ka Bay-41-4109 jauni analogi -heterildihidropirimidīni- salīdzinot ar Bay-41-4109 ir mazāk toksiski BHK-21 šūnās. Salīdzinot ar kontroles šūnām, vismazākā citotoksicitāte ir novērota V4-92 un V4-93, kas satur lipofilākus aizvietotājus 5.pozīcijā. Noteikts, ka šūnu dzīvotspēja pie 25 μM inhibitoru koncentrācijas

sastādīja attiecīgi 80% un 83%. Optimizētas kapsīdu un HBc noteikšanas metodes BHK-21 šūnās, pēc to infekcijas ar rekombinanto SFV1/HBc alfavīrusu: neskatoties uz ELISA metodes jutīgumu, ar komerciālo HBeAg ELISA nevar novērtēt kapsīdu veidošanās inhibitoru devas ietekmi uz veidoto kapsīdu daudzumu šūnās; Natīvas agarozes gēla elektroforēzes un imunoblota metode ir ļoti jutīga, tā ļauj noteikt līdz pat 10 ng HBV kapsīdu paraugā. Ar natīvas agarozes un Western blot metodēm ir parādīta BAY 41-4109 kapsīdu savākšanās inhibīcija no devas atkarīgā manierē. Salīdzinot ar oriģinālo BAY 41-4109 inhibitoru, neviens no trīs analizētajiem analogiem nav pietiekami efektīvs, lai uzrādītu būtisku HBc produkcijas samazināšanos SFV1/HBc inficētās šūnās. Inhibitors V4-93 inducē ar natīvas agarozes gēla elektroforēzes imunoblota metodi detektējamu HBc agregātu veidošanos, kuru identificēšanai un ietekmei uz vīrusa replikāciju ir nepieciešami tālāki pētījumi.

Ir sagatavota metodika hepatīta B vīrusa kapsīdas proteīna pašasociācijas (*self-assembly*) inhibitoru izvērtēšanai, daļa iegūto rezultātu iekļauti rakstā, kas publicēts *Intervirology*, kā arī prezentēti starptautiskā konferencē un atspoguļoti bakalaura darbā.

A3.6. dsRNS molekulu aktivitātes izpēte primārās audzēju šūnu un imūnšūnu kultūrās (Dr. Pjanova; BMC)

Šajā posmā tika vērtēta atsevišķu dsRNS inducēto citokīnu iespējamā mijiedarbība. Ar ELISA metodes palīdzību tika noteikta divu antagonistu, IL-10 un IFN- γ indukcija. Diemžēl cerēto IFN- γ produkcijas samazināšanos, pieaugot IL-10 koncentrācijai, nenovērojām. Tāpat ELISA metode tika izmantota, lai apstiprinātu augsto MIP-1 β produkciju un IL-16 supresiju. MIP-1 β augstā indukcija apstiprinājās, kas ir kontekstā ar dsRNS antivirālo darbību, savukārt, IL-16 supresija neapstiprinājās un varēja novērot ļoti lielas atšķirības starp indivīdiem. Darbs pie individuālo reakciju analīzes vēl turpinās. Dubultspiralizētās dsRNS ietekmes analīzei uz audzēja šūnām tika izmantotas 13 dažādas audzēju šūnu līnijas (melanomas - FM3, FM9, FM55, FM94, SkMel28, LVC5, krūts audzēji - SkBr3, MCF7, olnīcu audzējs - SKOV-3, dzemdes kakla audzējs - HeLa, aizkuņģa dziedzera audzējs - HPAF-II, kuņģa audzējs - AGS, rābdomiosarkoma - RD), un analizēta audzēju šūnu mitotiskā aktivitāte pēc to tiešas apstrādes ar dsRNS. Statistiski ticamas atšķirības tika novērotas divu šūnu līniju gadījumos (SKOV-3 un HPAF-II), tāpēc dsRNS netiešās ietekmes analīzei tika izvēlēta HPAF-II šūnu līnija, kur audzēja šūnu mitotiskā aktivitāte tika noteikta pēc to apstrādes ar limfocītiem, kas iepriekš bija kontaktā ar dsRNS. Aktivēto limfocītu ietekme uz audzēja šūnām bija atšķirīga un variēja starp donoriem, kas vēlreiz parāda, ka dsRNS ietekme ir stipri personalizēta.

Šie rezultāti ir prezentēti RSU Zinātniskajā konferencē, par tiem ir sagatavota publikācija, kas iesniegta *Immunologic Research* un aizstāvēts bakalaura darbs.

WP4: Iegūto savienojumu testēšana *in vivo* un imūnoterapijas stratēģiju preklīniskie izmēģinājumi

A4.2. Perspektīvāko MMP inhibitoru testēšana transplantētos peļu audzēju modeļos (Dr. Domračeva/Dr. Veinbergs; OSI)

Angioģenēzes pētījumos *in vitro* tika izmantota cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnu līnija (HUVEC-2). Kapilāru tīkla struktūras veidošanu novēroja, audzējot endotēlija šūnas uz ekstracelulāra matricas (matrigels), izmantojot citā aprakstīto metodi (In vitro angiogenesis assay kit, Cayman). Tika pētīta sintezēto savienojumu ietekme uz audzēju augšanu *in vivo*. Darbam *in vivo* izmantoja BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix High Concentration (ekstracelulārais matricss). Kā dzīvnieku modelis tika izmantotas Balb/c AnNCrl peļu mātiņas.

Pētījumu rezultātā noskaidrots, kā četriem selenofēnkumarīnu atvasinājumiem piemīt izteiktās MMP inhibējošās īpašības, kaut gan šie savienojumi neparādīja izteiktu ietekmi uz angioģenēzes procesu *in vitro* un *in vivo*. Pētījumi tiks turpināti.

A4.3. Alfavīrusu vektoru un to liposomālo savienojumu bioizpaltības izpēte un terapeitisko efektu novērtēšana peļu audzēju modeļos (Dr. Zajakina; BMC)

Šī darba posma mērķis bija izpētīt dažādas gēnu piegādes stratēģijas peļu audzēju modeļos, izmantojot rekombinantus alfavīrusu vektorus un nevirālās gēnu piegādes sistēmas. Luciferāzes gēnu kodējošais Semliki meža vīruss (SFV/Luc vīrusa daļiņas) un šī vīrusa RNS genoma lipopleksi (SFV/Luc RNS molekula) tika izmantoti bioizplatīšanas pētījumos peļu vēža modeļos: peļu krūts vēzis (Balb/c 4T1

un TS/A) un peļu melanoma (C57BL/6B16). Šajā posmā mēs parādījām SFV/Luc vīrusa daļiņu dominējošu lokalizāciju audzējos pie optimizētas vīrusa devas un sistēmiskas vīrusa ievadīšanas (i.v. un i.p.) gan krūts vēža, gan melanomas modeļos. Interesanti, ka vīrusa devas palielināšana noved pie vīrusa plašākas izplatīšanās organismā ar maksimālo ekspresiju sirdī un plaušās. Tāpat tika izpētīts SFV RNS gēnu piegādes potenciāls. Tomēr, neskatoties uz labiem RNS transfekcijas rezultātiem ar SFV/Luc RNS un 1,3-dihidropiridīna atvasinājumu kompleksiem vēža šūnu kultūrās *in vitro*, kas nodrošināja 40-60% transfekcijas efektivitātes (FACS rezultāti), ne intravenozās, ne intratumorālās RNS/lipopleksu injekcijas nenodrošināja augstāku transgēna ekspresiju audzējos, salīdzinot ar brīvo RNS intratumorālo injekciju un vīrusa daļiņu intratumorālo un sistēmisko ievadīšanu. Mēs secinājām, ka *enhanced permeability and retention effect* nespēj nodrošināt liposomālo daļiņu intratumorālo lokalizāciju un augstāku transgēna ekspresiju. Citi faktori, tādi kā liposomālo daļiņu izmērs (vidēji 120 nm – Zetasizer Nano), daļiņu internalizācija šūnās 3D apstākļos *in vivo* (*entry*), RNS endosomāla atbrīvošanās šūnās (*RNA release*), kā arī iedzīmtā imūnatbilde pret daļiņām (innate immune response), var ietekmēt piegādes efektivitāti. Vīrusu vektoru un brīvās RNS bioizplatīšanas pētījumu rezultāti ir atspoguļoti J. Vasiļevskas promocijas darbā.

Meklējot jaunas stratēģijas alfavīrusu piegādes paaugstināšanai, vienlaicīgi ar jau izteiktajām idejām par daļiņu adresēšanu (*targeting*), izmantojot audzēju adreses peptīdus (*tumor homing peptides*) un RNS stabilizēšanu ar pseidouridīna iebūvēšanu RNS molekulā, mēs pētām alfavīrusu piegādi ar magnētiskām nanodaļiņām, sorbējot vīrusus uz modificētām nanodaļiņu virsmas. Tika parādīts, ka vīrusa magnetofekcija ar dažādām modificētām magnētiskām daļiņām spēj paaugstināt infekcijas efektivitāti vēža šūnu kultūrās par 20-30 reizēm. Šie starpdisciplinārie rezultāti tika atspoguļoti publikācijā, kas iesniegta *Journal of Virology Methods*.

Izmantojot iepriekšējā posmā sintezētus alfavīrusu vektorus (A2.7.: SFV/mIFN γ , SFV/Luc; SFV/mTNF α ; uc), tika izpētīta dažu vektoru spēja piegādāt transgēnu peļu 4T1 modeli (mIFN γ i.t. ekspresijas līmenis). Sākotnējie terapeitiskā potenciāla pētījumu rezultāti uzrādīja, ka mIFN- γ kodējošais alfavīruss spēj programmēt makrofāgu polarizāciju vēža supresīvā fenotipā caur TLRs *in vitro* (vēža šūnu augšanas inhibīcijas eksperimenti). Daļa no šiem rezultātiem tika iekļauta maģistra darbā.

Vairākas projekta aktivitātes tika īstenotas ciešā sadarbībā ar ārvalstu partneriem Šveicē, Austrijā un Norvēģijā, kas deva iespēju veikt eksperimentus visaugstākajā zinātniskajā līmenī, izmantojot aparāturu, kas Latvijā nav pieejama, kā arī kalpoja par pamatu sadarbības projektu pieteikumiem tādos konkursos kā H2020-MSCA-IF-2015, ERA-NET TRANSCAN-2 un EuroNanoMed2. Turklāt OSI iegūtie rezultāti deva iespēju noslēgt komerciālu sadarbību ar Antvērpenes Universitāti par standartvielu sintēzi pret-vēža zāļu skrīningam.

4. Projekta Nr. 3 apgūtais finansējums (euro):

		Plānots 2014. – 2017.g.	3.posms (atbilstoši programm as aprakstam)	3.posms (atbilstoši līgumam)	Projekts Nr. 3.1		Projekts Nr. 3.2		Projekts Nr. 3.3		Projekts Nr. 3.4		Projekts Nr. 3.5	
					Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski
1000– 9000*	IZDEVUMI – KOPĀ	889 875	248 338	188 447	22802	22802	7790	7790	14824	14824	21484	21484	27324	27324
1000	Atlīdzība	613 948	174 738	123 129	17213	20729	6520	6943	10460	11368	12663	16938	18307	18298
2000	Preces un pakalpojumi (2100 + 2200)	270 907	72 604	64 918	5589	2073	1270	847	4364	3456	8821	2429	9017	8294
2100	Mācību, darba un dienesta komandējumi, dienesta, darba braucieni	12 800	5 700	4 300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2200	Pakalpojumi	120 691	30 914	20 488	2073	2073	708	708	1348	2000	1953	2335	2484	2826
2300	Krājumi, materiāli, energoresursi, preces, medicīniskās ierīces, med.instrumenti, lab.dzīvnieki un to uzturēšana	20495	20492	20495	3516	0	562	139	3016	1456	6868	93	6533	5468
5000	Pamatkapitāla veidošana	5 020	1 000	400	0	0	0	0	0	0	0	2118	0	732

		Plānots 2014. – 2017.g.	3.posms (atbilstoši programm as aprakstam)	3.posms (atbilst. Līg.)	Projekts Nr. 3.6		Projekts Nr. 3.7		Projekts Nr. 3.8		Projekts Nr. 3.9		Projekts Nr. 3.10	
					Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski	Plānots	Faktiski
1000 – 9000 *	IZDEVUMI – KOPĀ	889 875	248 338	188 447	32772	32772	16387	16387	10242	10242	17411	17411	17411	17411
1000	Atlīdzība	613 948	174 738	123 129	22340	16961	8317	8134	6370	6369	11463	11461	9476	8950
2000	Preces un pakalpojumi (2100 + 2200)	270 907	72 604	64 918	10032	15812	8070	8253	3872	3873	5948	5950	7935	8461
2100	Mācību, darba un dienesta komandējumi, dienesta, darba braucieni	12 800	5 700	4 300	1200	1143	1600	1026	0	0	0	0	1500	0
2200	Pakalpojumi	120 691	30 914	20 488	3277	3277	1639	1645	1024	1024	2741	1739	3241	2105
2300	Krājumi, materiāli, energoresursi, preces, medicīniskās ierīces, med.instrumenti, lab.dzīvnieki un to uzturēšana	19635	19635	19635	5555	11391	4831	5583	2848	2848	3207	4210	3194	6356
5000	Pamatkapitāla veidošana	5 020	1 000	400	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Minētie skaitļi ir budžeta finansēšanas klasifikācijas kodi.

5. Projekta Nr. 3 rezultatīvie rādītāji

(Norāda pārskata periodā plānotos un sasniegtos rezultātos rādītājus. Informāciju atspoguļo tabulā un pielikumā)

Rezultatīvais rādītājs	Plānots 2014 – 2017. g.	2016. g.		Piezīmes
		Plānots	Faktisk s	
Zinātniskie rezultatīvie rādītāji				
1. Zinātnisko publikāciju skaits:				
oriģinālo zinātnisko rakstu (SCOPUS) (SNIP > 1) skaits	1		1	A1.2. (iesniegts)
Web of Science vai SCOPUS datubāzēs iekļautajos izdevumos publicēti oriģināli recenzēti raksti (SNIP ≤ 1)	13	5	6	A3.4 A2.1. (labošanā) A2.1., A3.1., A3.6., A4. 3. (iesniegtas)
Attiecīgās nozares ministrijas atzītās specializētajās datu bāzēs publicēti zinātniski raksti (PubMed, CAPLUS)				
Konferences ziņojums (tēzes)	10	4	7	A1.2, A2.4 (4 gab), A3.4, A3.6
oriģinālo zinātnisko rakstu ERIH (A un B) datubāzē iekļautajos žurnālos vai konferenču rakstu krājumos recenzētu zinātnisku monogrāfiju skaits				
2. Programmas ietvaros aizstāvēto darbu skaits:				
promocijas darbu skaits	2	1	1	A4.3
maģistra darbu skaits	3		3	A2.4 (2 gab); A4.3
Bakalaura darbu skaits			3	A3.1; A3.5; A3.6
Programmas popularizēšanas rezultatīvie rādītāji				
1. Programmas gaitas un rezultātu popularizēšanas interaktīvie pasākumi, kuru mērķu grupās iekļauti arī izglītojamie, skaits:				
konferences				
semināri			1	A2.4.: A.Plotnieces referāts Latvijas Farmakoloģijas biedrības 2016. gada rudens sēdē, 01.12.2016
riekotie semināri	4	1	1	VPP Onkoloģijas bloka seminārs, 10.11.2016
populārzinātniskas publikācijas/pasākumi		1	1	Dalība Zinātnieku nakts pasākumā BMC (30.09.2016.)
izstādes				
video			1	https://www.youtube.com/watch?v=nRxmilpLNTI
Tautsaimnieciskie rezultatīvie rādītāji				
1. Zinātniskajai institūcijai programmas ietvaros piesaistītā privātā finansējuma apjoms:				

1.1. privātā sektora līdzfinansējums programmā iekļauto projektu īstenošanai				
1.2. ieņēmumi no programmas ietvaros radītā intelektuālā īpašuma komercializēšanas (rūpnieciskā īpašuma tiesību atsavināšana, licencēšana, izņēmumu tiesību vai lietošanas tiesību piešķiršana par atlīdzību)				
1.3. ieņēmumi no līgumdarbiem, kas balstās uz programmas ietvaros radītajiem rezultātiem un zinātnības	15 000	5 000	6000	Līgumdarbi pret-vēža zāļu izstrādes jomā OSI
2. Programmas ietvaros pieteikto, reģistrēto un spēkā uzturēto patentu vai augu šķirņu skaits:				
Latvijas teritorijā	3		1	A2.3. iesniegts
ārpus Latvijas			1	A3.3. PCT/IB2016/054341, saņemts pozitīvs atzinums
3. Programmas ietvaros izstrādāto jauno tehnoloģiju, metožu, prototipu vai pakalpojumu skaits, kas aprobētas uzņēmumos	1			
4. Ieviešanai nodoto jauno tehnoloģiju, metožu, prototipu, produktu vai pakalpojumu skaits (noslēgtie līgumi par intelektuālā īpašuma nodošanu)	1			

6. Projekta Nr. 3 īstenošanas analīze

Stiprās puses	Vājās puses
<ul style="list-style-type: none"> Iegūtie rezultāti apstiprina izvirzītās hipotēzes. Augsti kvalificēts un pieredzējis zinātniskais personāls. Efektīva un labi koordinēta sadarbība starp sintētiķu un bioloģiskās aktivitātes izpētes grupām. Efektīva sadarbība ar Rīgas Austrumu Klīnisko Universitātes slimnīcu dod iespēju veikt pētījumus ar labi anotētiem klīniskajiem paraugiem. Cieša sadarbībā ar Cīrihes Klīniskās Universitātes slimnīcas Patoloģijas centru un Cīrihes Universitāti paver iespēju veikt ļoti augsta zinātniskā līmeņa eksperimentus, izmantojot iekārtas, kādas Latvijā nav pieejamas, kā arī iegūt pieredzi un prasmes jaunu tehnoloģiju izmantošanā. Iegūtie rezultāti, pieredze un iestrādes veicina pētījumu attīstību. Potenciālu bioloģiski aktīvu aģentu struktūras-aktivitātes pētījumi ļauj efektīvi plānot turpmākus pētījumus, lai sasniegtu proponēto mērķi. 	<ul style="list-style-type: none"> Nepietiekami finanšu resursi neļauj padziļināt vai paplašināt pētījumus perspektīvajos virzienos. Nepietiekami finanšu resursi ierobežo iespēju piesaistīt projekta īstenošanai jaunus zinātniekus un studentus. Nepietiekami finanšu resursi ierobežo iegūt un izmantot mūsdienīgu modernu tehniku un aprīkojumu pētījumu veikšanai. Aparatūras bojājumi, piemēram, bojāts konfokālais mikroskops un plūsmas citometrs, apgrūtina vairāku aktivitāšu īstenošanu.
Iespējas	Draudi

<ul style="list-style-type: none"> • Iegūtie rezultāti paver iespējas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ atklāt jaunas struktūras-aktivitātes sakarības zāļu transportformu izstrādei; ✓ atklāt jaunas struktūras-aktivitātes sakarības pašasociējošos molekulu veidoto nanoagregātu raksturojumam un pielietojumam; ✓ izstrādāt jaunas imunoterapijas stratēģijas, kas balstītas uz TLS veidošanās stimulāciju vai ekstracelulārās acidozes neitralizēšanu; ✓ noskaidrot jaunas dsRNS imūnmodulējošās īpašības; ✓ iegūtie MMP inhibēšanas dati dod plašu zinātniskās informācijas klāstu selenofēnkumarīnu darbības mehānisma noskaidrošanai; ✓ samērā īsā laikā uzkrāt vērtīgu zinātnisku informāciju par struktūras-aktivitātes sakarībām jaunuIDO inhibitoru jomā. • Sadarbība ar augstskolām, tai skaitā Eiropas valstu universitātēm, paver iespēju piesaistīt izcilus studentus kvalifikācijas darbu izstrādei. • Iegūtie rezultāti un iespējas tos prezentēt starptautiskajā zinātniskajā sabiedrībā paver iespējas jaunu starptautisku kontaktu dibināšanai, perspektīvas zinātniskajai sadarbībai nākotnē. 	<ul style="list-style-type: none"> • Finansējuma samazināšana apdraud plānoto pētījumu veikšanu pilnā apmērā, samazina iespējas rezultātu aprobācijai.
---	---

7. Projekta Nr. 3 identificētie riski un to samazināšanas vai novēršanas pasākumi

Noraidīto publikāciju īpatsvars žurnālos ar augstu IF vēža izpētes jomā ir liels, tādēļ vairākus rakstus var nākties rediģēt un iesniegt atkārtoti, kas var aizkavēt rezultatīvo rādītāju sasniegšanu. Tomēr uz šo brīdi ir sagatavotas vairāk publikācijas kā sākotnēji plānots, kas palielina iespēju, ka līdz projekta īstenošanas beigām visi rezultātu rādītāji tiks sasniegti.

Aktivitātes A1.2. ietvaros iegūto rezultātu validācijai ir nepieciešama neatkarīga trīskārši negatīvā krūts vēža (TNBC) paraugu kolekcija, ko paredzēts izveidot sadarbībā ar RAKUS Patoloģijas centru. Iespējams, ka Patoloģijas centra arhīvā nebūs pieejams atbilstošs skaits TNBC parafīna bloku, tādēļ pētījumā nāksies iesaistīt jaunus pacientus, kas var nedaudz aizkavēt aktivitātes īstenošanu.

Aktivitāšu A1.2/3.1. galvenais zinātniskais risks ir tas, ka novērotā saistība starp augstu CAIX ekspresiju un samazinātu efektoro imūnšūnu infiltrāciju, ir atkarīga nevis no CAIX funkcionālās aktivitātes, bet gan atspoguļo hipoksiskas vides ietekmi, un tādēļ CAIX enzīma inhibīcija neietekmēs imūnšūnu infiltrāciju. Pašlaik tiek veikta virkne eksperimentu, lai šo jautājumu noskaidrotu. Ja tas apstiprināsies, tiks izslēgta iespēja izveidot šādu imunoterapijas stratēģiju, taču iegūtie rezultāti būs zinātniski nozīmīgi un nemazina CAIX kā terapijas mērķa nozīmi vēža šūnu migrācijas un pašatjaunošanās spējas kavēšanai.

Aktivitātes A2.1. realizācijas laikā izrādījās, ka ne visi kumarīna slāpekļa heterocikliskie atvasinājumi ir ogļskābes anhidrāzes inhibitori. Piridīna gredzenu saturošie inhibitori izrādīja CAIX

un CAXII izoformu selektivitāti, bet pirazola atvasinājumi nebija aktīvi kā CA inhibitori. Turpmākajā darba attīstības gaitā pēc projekta beigām būtu nepieciešams attīstīt un optimizēt piridīna atvasinājumu efektivitāti un pārbaudīt šo savienojumu inhibējošo ietekmi uz citiem metāl atkarīgajiem enzīmiem.

Aktivitātes A2.2. realizācijas laikā izrādījās, ka līdzšinējās veiksmīgi izmantotās olefīnu aziridinēšanas metodes paplašinot izmantoto olefīnu klāstu nedod pozitīvus rezultātus. Tāpēc jau 2016. gadā tika veikti pirmie eksperimenti un tie ir plānoti arī 2017. gadā tā, lai izmainītu reakciju apstākļus un atrastu jaunas aziridīnu sintēzes metodes kā izejvielas izmantojot dabas olefīnus. Blakus projektā (Dr. B.Štrumfa iesniegtais ERAF 1.1.1.2. projekta pieteikums) ir ielānota alternatīva pieeja problēmas risinājumam – aziridīnu beta-arilēšanas metodes izstrāde un jaunu būvbloku izveide.

Aktivitātes A2.4. ietvaros galvenais identificētais risks ir sazarotu alkanolu apgrūtinātā reaģētspēja, salīdzinot ar to lineāriem analogiem, kā rezultātā iegūtās nekomerciālās izejvielas izmaksā dārgāk (lielāki daudzumi, zemāki iznākumi, ilgāks reakcijas laiks, nepieciešama papildus attīrīšana utt). Tāpat iegūto vielu daudzumi var izrādīties nepietiekami pilnīgam skrīningam, iegūšanai plānotais laiks īsāks, nekā reāli nepieciešamais. Lai risinātu šo problēmu, tika meklētas un lietotas mūsdienīgas sintēzes metodes, lietojot katalizatorus un attīrītas mūsdienīgas attīrīšanas metodes. Posma īstenošanas laikā apzinātie riski tika novērsti, savienojumi sintezēti. Tāpat pastāv zināms risks, ka perspektīvā jaunsintezētie savienojumi var izrādīties nepietiekami aktīvi.

Aktivitātes A3.6 galvenais risks ir krasi atšķirīgās individuālās reakcijas, kas prasa rūpīgu rezultātu izvērtēšanu un atbilstošu statistisko metožu piemeklēšanu. Risinājums varētu būt lielāks analizējamo cilvēku (paraugu) skaits, kas vienlaicīgi gan sadārdzinātu projekta realizēšanu.

Jaunsintezētie savienojumi var izrādīties nepietiekami aktīvi, vai toksiski. Aktivitātes 3.1-3.4 ir vērstas uz jaunu *in vitro* testa sistēmu un modeļsistēmu izstrādi, kas dod iespēju testēt lielāku skaitu savienojumu un *in vivo* testiem atlasīt tikai aktīvākos un mazāk toksiskos savienojumus.

Projekta Nr.3 vadītājs: _____ Aija Linē _____
(paraksts) (datums)

Zinātniskās institūcijas vadītājs: _____ _____
(paraksts) (datums)

Zinātniskie raksti (SNIP > 1)

Iesniegtās publikācijas

1. A1.2. Siliņa K*, Soltermann A, Attar FM, Casanova R, Uckeley Z, Thut H, Simmler P, Isajevs S, Cheng P, Foukas P, Levesque M, Moch H, Linē A, van den Broek M*. Germinal centers underlie the prognostic benefit of tertiary lymphoid structures in patients with lung squamous cell carcinoma, submitted to *Cancer Cell*.

Zinātniskie raksti (SNIP ≤ 1)

Iznākušās publikācijas

1. A3.4. Pumpens P, Renhofa R, Dishlers A, Kozlovska T, Ose V, Pushko P, Tars K, Grens. E, Bachmann MF. The True Story and Advantages of RNA Phage Capsids as Nanotools. *Intervirology*. 2016 Nov 10;59(2):74-110. PubMed PMID: 27829245. (IF=1.822; SNIP=0.52) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829245>;

Rediģēšanā esošās publikācijas

2. A2.1. J. Strazdina, B. Strumfs, N. Romanchikova, P. Trapencieris. Novel aziridine-based Bruton's tyrosine kinase inhibitors, under revision in *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 2016.

Iesniegtās publikācijas

3. A2.1. I. Vendina, A. Parkova, J. Chertova, Dz. Zarina, M. Katkevics, R. Zalubovskis, A. Maresca, A. Scozzafava, C. Supuran, P. Trapencieris. Bicyclic and tricyclic coumarines as carbonic anhydrase inhibitors, submitted to *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 2016.
4. A3.1. Zandberga E, Pūpola D, Zayakin P, Ābols A, Trapencieris P and Linē A. Depletion of carbonic anhydrase IX abrogates hypoxia-induced overexpression of Stanniocalcin-1 in triple negative breast cancer cells, submitted to *Cancer Biology & Therapy*.
5. A3.6. Vaivode K, Mandrika L, Petrovska R, Marska I, Brūvere R, Doniņa S, Pjanova D. Double-stranded RNA effect on molecule expression and lymphocyte subpopulations in ex vivo cultivated peripheral blood mononuclear cells, submitted to *Immunologic Research*.
6. A4.3. Baiba Ķūrēna, Dace Skrastiņa, Aleksandra Vežāne and Anna Zajakina. Magnetic nano-particles for efficient cell transduction with Semliki Forest virus, submitted to *Journal of Virology Methods*.

Patentu pieteikumi

1. A2.5. Starptautisks patenta pieteikums PCT/IB2016/05434, P. Arsenjans, J. Vasiļjeva, I. Domračeva, I. Šestakova, Ivars Kalviņš. Antimetastatic 2H-selenopheno[3,2-h]chromenes, synthesis thereof, and methods of using same agents (saņemts pozitīvs atzinums)
2. A2.3. LR patenta pieteikums: I. Timofejeva, T. Kozlovska, A. Vežāne, G. Apsīte, V. Ose, R. Brūvere, B. Vīgante, A. Plotniece, E. Bisenieks, G. Duburs. "Jauni bioloģiski aktīvi enaminoēsteru atvasinājumi kā līdzekļi ķīmijterapijai".

Konferenču tēzes

1. A1.2. Zandberga E, Orlova V, Siliņa K, Isajevs S, Sperga M and Linē A. Carbonic Anhidrase IX Contributes to the Induction of Immunosuppressive Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer. 2nd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy, Athens, Greece, December 15-17, 2016 <http://hellenic-immunooncology.gr/2soio/scientific-program/tentative-program.html> (best poster prize)
2. A2.4. Plotniece A., Pajuste Kl., Rucins M., Vezane A., Timofejeva I., Petrichenko O., Vīgante B., Ose V., Plotniece M., Bandere D., Gosteva M., Sobolev A., Kozlovska T., Pajuste K. Structure-activity relationships of a series of self-assembling compounds on 1,4-dihydropyridine core as delivery agents. 30th Conference of The European Colloid and

- Interface Society, ECIS-2016, September 4-9, 2016: Rome, Italy, 2015; P6.60; 527.
<https://ecis2016.org/sites/default/files/ECIS-2016-Poster-Book-of-Abstracts.pdf>
- A2.4. Apsite G., Vigante B., Timofejeva I., Vezane A., Kozlovska T., Plotniece A., Rucins M., Pajuste K., Sobolev A. Studies of gene delivery activity of aliphatic cationic head group containing 1,4-dihydropyridine. Book of Abstracts, 13th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN16), July 5-8, 2016, Thessaloniki, Greece, 232.
http://www.nanotextology.com/2016/images/stories/food/NN16_PROGRAM.pdf
 - A2.4. Gruebler B., Pajuste Kl., Rucins M., Plotniece M., Pajuste K., Sobolev A., Plotniece A. Studies of transesterification reactions of ethyl acetoacetate with alcohols catalysed by lipases. Program and Abstracts, International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum (BOS-2016), July 3-6, 2016: PO032. Riga, Latvia, 2016; 69.
http://www.boschem.eu/public/BOS2016/BOS-2016_Anstract-Book_Final.pdf
 - A2.4. Vigante B., Rucins M., Muhamadejev R., Petrova M., Pajuste K., Plotniece A., Sobolev A. Synthesis and application of 3-substituted nitrodienamines in heterocyclic annulation reaction. Program and Abstracts, International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum (BOS-2016), July 3-6, 2016: PO135. Riga, Latvia, 2016; 172. http://www.boschem.eu/public/BOS2016/BOS-2016_Anstract-Book_Final.pdf
 - A3.5. Karina Spunde, Regina Renhofa, Alexeys Fjodorovs, Alexandra Vezane, Tatyana Kozlovska, Investigation of interaction of preS1-addressed virus like particles with hepatitis B virus receptor NTCP expressed in mammalian cells, Journal of Biotechnology, Volume 231, Supplement, 10 August 2016, Pages S9-S10,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.059> IF-2,667,SNIP=0,994.
 - A3.6. Vaivode K, Brūvere R, Petrovska R, Doniņa S, Marska I, Magone S, Feldmane G, Pjanova D. Dubultspirālizēto RNS ex vivo inducētie citokīni. RSU Zinātniskā konference, 18. marts, 2016.

Aizstāvētie pētniecības darbi

Doktora disertācijas

- A4.3. J. Vasiļevska: "Alfavīrusu vektori, kā gēnu piegādes līdzekļi vēža terapijai", (20.12. 2016, LU).

Maģistra darbi

- A2.4. Madara Jēkabsons, maģistra darbs: "Ar amīniem modificētu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu sintēze un īpašību pētījumi" (2016, LU, Medicīnas fakultāte)
- A2.4. Birgit Grubler, maģistra darbs: "Synthesis and evaluation of self-assembling properties of cationic amphiphilic pyridinium derivatives based on 1,4-dihydropyridine core with variation of the lipophilic part" (2016, Grācas Universitāte, Austrija)
- A4.3. Baiba Ķūrēna, maģistra darbs: "Vēža imūnterapijas alfavīrusu vektoru izstrādāšana makrofāgu aktivācijai" (2016, LU Bioloģijas fakultāte).

Bakalaura darbi

- A3.1. Dārta Pūpola, bakalaura darbs: „Ogļskābes anhidrāzes IX ietekme uz signālceļiem krūts vēža šūnu līnijās”, (2016, LU Bioloģijas Fakultāte).
- A3.5. Dubova Unda Nelda, bakalaura darbs: "HBV kapsīdu savākšanās inhibīcija ar mazmolekulāriem savienojumiem", (2016, LU Bioloģijas Fakultāte).
- A3.6. Laima Mandriķa, bakalaura darbs: "Dubultspirālizēto RNS modulējošās īpašības perifēro asiņu mononukleārās šūnās un audzēju šūnās" (2016, LU Bioloģijas Fakultāte).