



Biotechnologijos institutas

Vilniaus universitetas

Žmogaus Hsp90 šaperono slopiklių farmakokinetinių savybių, toksiškumo bei priešvėžinio aktyvumo tyrimas

Projekto vykdytoja: Dr. Vilma Petrikaitė

Projekto vadovas: Dr. Daumantas Matulis

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorija

Kontaktai: vilma@ibt.lt

Tyrimų aktualumas

Šiandien vėžys yra viena dažniausių mirties priežasčių. Nepaisant pažangos diagnostikos ir gydymo srityse, sėkmingai išgydyti vėžį pavyksta maždaug 20 proc. atvejų, todėl vėžinių ligų gydymas tapo ypač svarbus pastaruoju metu. Vienas vėžio gydymo būdų yra chemoterapija. Vis dėlto, dauguma šiuolaikinių antinavikinių vaistų (alkilinantys, antimetabolitai, antimikrotubuliniai ir kt.) yra gana neatrankūs vėžinėms ląstelėms, veikia ir sveikas ląsteles, todėl yra toksiški žmogui ir sukelia daug pašalinių reiškinių.

Dabartiniu metu kuriamos naujos vaistinės medžiagos, kurios yra atrankios vėžio vystymosi procese dalyvaujantiems fermentams ar baltymams, todėl jos yra mažiau toksiškos žmogui. Vienas tokių baltymų yra žmogaus Hsp90 šaperonas, perspektyvus priešvėžinių vaistų taikynys. Šio baltymo tyrimai pasaulyje yra pradinėje stadijoje. Sukurtos kelios sintetinių mažo molekulinio svorio Hsp90 slopiklių klasės. Pirmieji purinų klasės slopikliai buvo sukurti, remiantis vaistų modeliavimo principais baltymo aktyvaus centro kristalinėje struktūroje. Neseniai S. R. Kasibhatla grupė paskelbė apie naujus purino darinius, kuriuose yra amino-, tio-, sulfinil- bei sulfonilgrupės. Vėliau susintetinti įvairūs 3,4-diarilpirazolų dariniai, turintys rezorcinolio fragmentą, eilė 3-arilpirazol-4-piperazino darinių, o taip pat ir 3-aril-4-ariloksipirazolai, ištirtas jų jungimasis su Hsp90.

Nors ir labai daug buvo susintetinta Hsp90 slopiklių, tik keli iš jų pateko į klinikinius tyrimus, kurie patvirtina šių vaistinių medžiagų kaip potencialių priešvėžinių vaistų kūrimo racionalumą. Tebėra didelis poreikis naujų efektyvių Hsp90 slopiklių, pasižyminčių vienu ar keliais pranašumų: didesniu aktyvumu, selektyvumu, tirpumu, mažu toksiškumu, ekonomiška sinteze ir pan. Taigi naujų Hsp90 šaperono slopiklių kūrimas vis dar lieka labai aktualia ir svarbia užduotimi.

Darbo tikslas - įvertinti Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje susintetintų aktyviausių Hsp90 slopiklių veiksmingumą, atliekant priešvėžinio aktyvumo (*allograft* ir *xenograft*) tyrimuose *in vivo*, o taikant imunohistocheminius metodus įvertinti junginių toksinį poveikį ir efektyvumą skirtingiems pelių audiniams. Šie tyrimai pasitarnaus kuriant naujus Hsp90 šaperono slopiklius - potencialius priešvėžinius vaistus, o darbo eigoje gauti rezultatai pasitarnaus vystant šiuolaikinio vėžio gydymo koncepcijas.

Planuojamų atlikti tyrimų pagrindimas ir eiga

Planuojamų tirti junginių jungimosi prie abiejų Hsp90 baltymų (N-terminalinio domeno Hsp90N ir pilno baltymo Hsp90F) konstantos buvo nustatytos *in vitro* izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu ir yra tokios: junginių, besijungiančių prie Hsp90 N-galinio domeno disociacijos konstantos (K_d) yra nuo $0,016 \pm 0,004 \mu\text{M}$ iki $0,034 \pm 0,003 \mu\text{M}$, o besijungiančių prie Hsp90 pilno baltymo disociacijos konstantos yra nuo $0,011 \pm 0,007 \mu\text{M}$ iki $0,057 \pm 0,002 \mu\text{M}$.

Junginių vėžinių ląstelių augimą slopinančios konstantos (GI_{50}) buvo nustatytos naudojant dvi vėžinių ląstelių linijas: U2OS (osteosarkoma) ir HeLa (cervikalinė karcinoma). Įvairių junginių GI_{50} U2OS (osteosarkoma) ląstelių atžvilgiu buvo nuo $0,65 \pm 0,08 \mu\text{M}$ iki $15,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$, o HeLa (cervikalinė karcinoma) ląstelių atžvilgiu – nuo $0,70 \pm 0,04 \mu\text{M}$ iki $4,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Toks didelis junginių efektyvumas slopinant vėžinių ląstelių augimą rodo, kad jie galėtų būti toliau vystomi kaip priešvėžiniai vaistai. Šie junginiai pasižymi ne mažesniu už egzistuojančius Hsp90 slopiklius, naudojamus kaip vaistai, efektyvumu, tačiau mūsų junginių sintezė yra paprastesnė ir ekonomiškesnė negu egzistuojančių Hsp90 slopiklių sintezė.

Šių Hsp90 slopiklių toksiškumas buvo įvertintas, panaudojant *Tox Boxes* programą (Pharma Algorithms, Inc., 2009). Kompiuterinės programos paskaičiuotos toksinės dozės pelėms *per os* yra apie 500 mg/kg. Literatūroje nepavyko aptikti duomenų apie jau klinikinių tyrimų antroje stadijoje tiriamo panašios struktūros junginio NVP AUY-922 toksiškumą.

Mūsų laboratorijoje susintetintų junginių (tiadiazolo darinių) toksiškumo tyrimai buvo atliekami nustatant didžiausią toleruojamą dozę *per os*. Nustatyta vieno junginio DTD yra apie 400 mg/kg.

Vienas eksperimentas truko 14 dienų arba iki stipraus toksinio poveikio pasireiškimo. Po to gyvūnas (pelė) buvo humaniškai nugaišinamas.

Junginių veiksmingumo tyrimus planuojama atlikti taikant *allograft* ir *xenograft* (pelei įskiepijus atitinkamai pelės arba žmogaus vėžinių ląstelių) metodiką, įvedant tiriamo junginio suspensiją *per os*. Literatūros duomenimis, vystant Hsp90 slopiklius ir atrenkant kandidatus klinikiniams tyrimams, panašios struktūros junginys NVP-AUY922 buvo skiriamas 50 mg/kg dozėmis vieną kartą per dieną į pilvaplėvės ertmę pelėms, kurioms po oda buvo įskiepytas žmogaus HCT16 gaubtinės žarnos vėžys [1].

Vėliau atlikti priešvėžinio aktyvumo tyrimai betimusinėms pelėms, suleidžiant įvairias NVP-AUY922 dozes į veną (joms buvo po oda įsodinti BT-474 krūties vėžiai). Nustatyta, kad 25 mg/kg dozės, leidžiamos pelėms į veną vieną kartą per savaitę, efektyviai slopino vėžio augimą ir buvo gerai toleruojamos. 8,3-17 mg/kg dozės nesukėlė reikšmingo vėžio augimo slopinimo, lyginant su kontroline gyvūnų grupe. Taip pat nustatyta, kad NVP-AUY922 pasižymi geromis farmakokinetinėmis savybėmis [2].

Kito tyrimo metu nustatyta, kad NVP-AUY922, leidžiamas betimusinėms pelėms į veną ar į pilvaplėvės ertmę 50 mg/kg/d. dozėmis, statistiškai reikšmingai slopino A2780 kiaušidžių auglio, U87MG glioblastomos, PC3 prostatos ir WM266.4 melanomos augimą [3].

Remdamiesi anksčiau atliktų mūsų junginių tyrimų rezultatais, o taip pat literatūroje pateiktais sėkmingai sukurtu NVP-AUY922 junginio tyrimų duomenimis, eksperimentams naudosime 30-300 mg/kg junginių dozes. Kiekvieno junginio veiksmingumas bus tiriamas atskirai. Viena grupė bus kontrolinė, kuri negaus jokio

gydymo (n=6-10); kitose grupėse bus po 6-10 gyvūnų. *Allograft* tyrimams naudosime C57BL/6xDBA/2 peles, joms bus implantuojamos hepatomos MH-22a ar panašios ląstelės. Xenograft tyrimams bus naudojamos linijinės DBA/2 pelės. Auglys auginamas iki 100-200 mm³ dydžio, tik tada pradedamas pelių gydymas mūsų laboratorijoje susintetintais junginiais. Eksperimento metu matuojamas auglio dydis ir pelių svoris.

Visiems tirtiems gyvūnams bus atliekamas bendrasis skrodimas, aprašomi visi dideli kiekvieno gyvūno patologiniai pokyčiai. Planuojama atlikti mikroskopinį organų tyrimą, siekiant išsiaiškinti daugiau informacijos apie tiriamų junginių toksinį poveikį.

Lietuvos sveikatos mokslų anatomijos institute bus atliekami imunohistocheminiai pelių audinių tyrimai, siekiant įvertinti junginių toksinį poveikį ir efektyvumą skirtingiems audiniams.

-
- [1] Brough PA, Aherne W, Barril X, et al. 4,5-diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008;51:196-219.
- [2] Jenssen MR, Schoepfer J, Radimerski, et al. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical cancer models. *Breast Cancer Res* 2008;10:R33.
- [3] Eccles SA, Massey A, Raynaud FI, et al. NVP-AUY922: A Novel Heat Shock Protein 90 Inhibitor Active against Xenograft Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Cancer Res* 2008;68(8):2850-60.