

Hõbekuulid vähiteraapias: teel suunatud vähiravi poole

Hedi Hunt¹, Pille Säälük¹, Kadri Toome¹, Artur Vetkas², Andres Asser³,
Tõnu Rätsep², Toomas Asser², Tambet Teesalu¹

Vähiuuringute üheks keskseks eesmärgiks on vähirakke normaalsetest rakkudest eristavate ravimite väljatöötamine. Kliinilises kasutuses olevate vähiravimite puuduseks on nende vähene selektiivsus ja sellest tingitud kõrvalmõjud normaalsetes kudedes. Artiklis on antud ülevaade suunatud vähiravimite väljatöötamisest ja suundumustest.

Suunatud vähiravi põhineb molekulaarsetel erinevustel vähikoe ja normaalsete veresoonte vahel. *In vivo* faagidisplei meetodi abil on võimalik veresoonte haiguspetsiifilisi molekulaarseid mustreid kaardistada. Selle tulemuseks on peptiidid, mis seostuvad selektiivselt vähiveresoontega. Need kullerpeptiidid nagu ka teised kasvaja veresoontega selektiivselt seonduvad molekulid (antikehad, aptameerid) võimaldavad kasvajasse viia vähiravimeid ja kontrastaineid. Hiljuti avastatud kasvajakude penetreerivad peptiidid põhjustavad vähiveresoonte selektiivset lekkimist. Koos ravimitega manustatuna põhjustavad need peptiidid ravimi väljumist kasvaja veresoontest ja tungimist kasvajakoesse – tulemuseks on ravimi terapeutilise indeksi paranemine.

Pahaloomuliste vähkkasvajate raviks kasutatakse paiksete raviviiside (kirurgiline eemaldamine, kiiritusravi) ja medikamentoosse ehk süsteemse ravi (keemia-, bioloogiline ja hormoonravi) kombinatsioone. Keemiaravi eesmärk on hävitada kasvajakasvaja või pärssida nende paljunemist. Aastakümnete pikkuse uurimistöö käigus on välja töötatud sadu kliiniliselt heaks kiidetud keemiaravimeid ja tuhandeid nende analooge, millest paljud põhjustavad rakusurma ülimaldala (kuni pikomolaarse) kontsentratsiooni juures. Tsütostaatikumide (sisuliselt rakumürkide) toime ei piirdu aga üksnes vähirakkudega, vaid need kahjustavad ka normaalsete rakke, eriti kiiresti paljunevaid rakke (erinevad vererakud, karvafolliikuli rakud, seedetrakti limaskestast rakud). Seetõttu on enamiku keemiaravimite terapeutiline aken (erinevus terapeutilise kontsentratsiooni alam- ja ülempiiri vahel) kitsas ning neid tuleb kõrvalnähtude talutavais piires hoidmiseks manustada vähivastase toime seisukohalt suboptimaalse doosina. Tulemuseks on ebapiisav ravivastus keemiaravile ja valikusurve, mis soodustab vähirakkude ravimiresistentsuse väljakujunemist.

TÜ arstiteaduskonna vähibioloogia laboratooriumi uurimistöö eesmärk on muuta vähiravimeid nii, et nad tunneksid ära ja

ründaksid üksnes maliigseid kudesid. Olulise suunana tegeleb laboratoorium kõrge maliigusega astrotsütoomide suhtes selektiivsete peptiidide väljatöötamisega. Multiformne glioblastoom on kõige sagedasem primaarne ajukasvaja, mis moodustab 51% glioomidest. Primaarsete ajukasvajate esinemine Eestis on 8,5 esmajuhtu 100 000 inimese kohta aastas (ligikaudu 90 primaarset ajukasvajad aastas). Parimaks võimalikuks ravimeetodiks on praegu tsütoreduktiivne kirurgiline sekumine koos järgneva kemoradioterapiaga (1). Maliigsete glioomide operatiivne ravi on pikemas perspektiivis vähetõhus kasvaja suure invasiivsuse tõttu, kuid maksimaalne reseksioon pikendab elulemust ning sümptomivaba aega oluliselt. Operatsiooni maht on tihti piiratud kriitiliste ajupiirkondade haaratuse tõttu. Multiformne glioblastoom on oma iseloomult radioresistentne ning postoperatiivse kiiritusraviga on võimalik saavutada üksnes haiguse lühiajaline stabilisatsioon. Kasvaja eemaldamise aste ja jääktuumori maht määravad retsidiveerumise ja elulemuse (2). Viimase aastakümne jooksul kasutusele võetud neuronavigatsioon, operatsiooniaegne ultraheli ning 5-alaniin võimaldavad radikaalselt eemaldada MRT-uringul kontrasteeruva tuumori, halvendamata patsiendi elukvaliteeti. Sellele

Eesti Arst 2015;
94(5):281–287

Saabunud toimetusse:
19.02.2015
Avaldamiseks vastu
võetud: 02.04.2015
Avaldatud internetis:
29.05.2015

¹ TÜ bio- ja siirdemeditsiini
instituudi vähibioloogia
laboratoorium,
² TÜ närvikliinik,
³ Põhja-Eesti
Regionaalhaigla
neurokirurgia osakond

Kirjavahetajaautor:
Tambet Teesalu
tteesalu@ut.ee

Võtmesõnad:
peptiid, täppisteraapia,
kemoterapia, vähktõbi

vaatamata on elulemuse mediaanväärtus glioblastoomi korral üks aasta.

Artiklis on antud ülevaade prekliinilisest ja kliinilisest tööst suunatud vähiravimite väljatöötamisel.

RAVIMI TEE TUUMORISSE

Veres ringlevad vähiravimid võivad kasvajakoesse jõuda passiivselt (passiivne transport, ingl *passive targeting*) või afiinsusel põhineva aktiivse suunamise (*active targeting*) kaudu. Enamik kliinilises kasutuses olevatest vähiravimitest on passiivelt suunatud. See kehtib nii klassikaliste kemoterapeutikumide kui ka uue põlvkonna sihtmärgistatud vähiravimite (kinaasi-inhibiitorid, terapeutilised antikehad, apoptoosimodulaatorid, proteasoomi inhibiitorid jt) puhul. Passiivne vähiravimite transport põhineb funktsionaalsetel erinevustel normaalsete ja maliigsete kudede vere- ja lümfisoonete vahel (3). Vähiveresooneid sarnanevad arenevates elundites kujunevate ehk angiogeneetiliste veresoontega, olles samas täiskasvanud organismi normaalsetest veresoontest ebakorrapärasema läbimõõdu ja hargnevusega ning suurema läbilaskvusega. Vähiveresoonte lekkivuse põhjuseks on nende mittetäielik kaetus endoteelirakkude ja peritsüütidega ning puudulikult toimivad basaalmembraanid (4). Neil omadustel põhinevat EPRI-efekti (*enhanced permeability and retention effect*) on detailselt uuritud ja rakendatud vähi loomudeliste eksperimentaalteraapias, kuid efekti mõju ulatuse kohta inimese tuumorites uurijate seisukohad erinevad.

Enamik konventsionaalseid kemoterapeutikume on madalmolekulaarsed, neeru filtratsioonibarjäärist (6000 daltonit) väiksemad ühendid, mille organismis ringlemise aega mõõdetakse minutites. Lisaks pole paljud tsütostaatikumid vees lahustuvad ning neid tuleb seetõttu lahustada toksilistes solventides (nt kastroolis taksooli puhul). Üheks võimalikuks strateegiaks vähiravimite plasma tsirkulatsiooniaja pikendamiseks ning nende lahustuvuse parandamiseks on nende n-ö pakkimine nanoosakesse. Kliinilises kasutuses olevad vähivastased nanoosakesed – vähiravimeid sisaldavad liposoomid ning albumiinil või polümeeridel põhinevad nanopartiklid – on võrreldes lähteravimitega parema lahustuvusega, vähem toksilised ja suurema kasvavastase mõjuga (5). Näiteks on USA toidu- ja ravi-

miametis (FDA) heaks kiidetud albumiini-paklitakseeli kompleks (Abraxane, tootja Celgene), mida kasutatakse metastaatilise rinnavähi, pankreasevähi ja mitteväikerakulise kopsuvähi raviks, mis on võrreldes vaba paklitakseeliga vähem toksiline ja paremini talutav ning võimaldab saavutada oluliselt suurema kasvajasisesse ravimikontsentratsiooni ja annab parema ravivastuse (6). Sarnaselt on doksorubitsiiniga laetud liposoomide (Doxil/Caelyx) puhul näidatud, et võrreldes konventsionaalsete doksorubitsiin-vesinikklooriidi preparaatidega on Caelyxi terapeutiline efektiivsus parem ning kardiotoksilisus (doksorubitsiini doosi limiteeriv toksilisus) väiksem kui lähteravimil. Doxil on kasutuses Kaposi sarkoomi, munasarjavähi, metastaatilise rinnavähi ja mitmikmüeloomi ravis. Samas pole kliinilises kasutuses olevad vähivastased nanoosakesed iseenesest vähirakkude suhtes selektiivsed, vaid jõuavad kasvajakudeni passiivse transpordi abil (7).

Vähiravimite aktiivne suunamine

Aktiivselt suunatud vähiravi eesmärk on saavutada süsteemselt manustatud ravimi selektiivne akumulatsioon vähikoes ja ravimi toopilise manustamisega sarnanev tulemus: suur lokaalne ja väike süsteemne kontsentratsioon. Tulemuseks on raviefektiivsuse parandamine ja/või kõrvalnähtude vähendamine. Aktiivselt suunatud vähiravi puhul on eesmärgiks kasutada ravimikandjana ehk kullerina selliseid molekule (antikehad, aptameerid, peptiidid – vt allpool), mis seonduvad üleekspresseeritud molekulidega kasvajaalsetes kudedes. Selliseid kasvajaspetsiifilisi n-ö signatuurmolekule ekspresseerivad ka kasvaja veresooneid, ning kuna veresooneid on erinevalt sügavamal paiknevatest kasvajakarakudest süsteemselt ligipääsetavad, on nad sobivaks sildumiskohaks tsirkuleerivatele kullermolekulravimi kompleksidele. Lisaks on veresooneid erinevalt kasvajakoes geneetiliselt stabiilsed ja resistentsuse kujunemine teraapia suhtes vähem tõenäoline. Suur osa soliidtuumoritest on n-ö lukustunud angiogeenses, aktiivselt uusi veresooni loovas faasis. Uute veresoonte teke võimaldab kasvajakarakude ligipääsu toitainetele ja teeb võimalikuks nende metastaatilise leviku (8). Aktiivse, kullermolekulidel põhineva suunamise jaoks huvipakkuvad angiogeensete veresoonte signatuurmolekulid on näiteks vähivere-

soontes ülereguleeritud rakumembraani või ekstratsellulaarse matriksi valgud, näiteks kindlat tüüpi integriinid, endoteliaalse kasvufaktori retseptorid, erinevad rakuvälise matriksi molekulid (nt laminiini, tenastiini, fibronektiini ja versikaani isovormid), rakupinna proteoglükaanid ja proteaasid (erinevad matriksi-metalloproteinaasid, plasminogeeni aktivaatorid) (8, 9). Paljud neist molekulidest täidavad angiogeneesis olulisi ülesandeid ja ekspresseeruvad normaalsetes arenevates kudedes aset leidva angiogeneesi käigus (10, 11). Lisaks geneerilistele angiogeneesiga seotud molekulidele üleekspresseeritakse tuumori veresoontes vähitüübist, selle arengujärgust ja lokalisatsioonist sõltuvaid molekule (nt PSMA eesnäärmevähis ja CD13 rinnavähis) (12). Ka on lisaks veresoontes ekspresseeruvatele markeritele võimalik ravimite aktiivseks suunamiseks rakendada mõningaid kasvajakude pinnamarkereid. Kuna mitmete kasvajatüüpide puhul on näidatud, et kasvajakud ise on võimelised veresoontelaadseid struktuure moodustama, teeb see omadus nad tsirkuleerivatele ravimitele otseselt ligipääsetavaks.

Võimalikest afiinsusmoodulitest (antikehad, aptameerid, peptiidid) on seni vähiteraapia suunamiseks kõige ulatuslikumalt kasutatud antikehi. Praegu kasutatakse vähiraviks kahte antikeha ja ravimi konjugaati (*antibody-drug conjugate*, ADC). Adcetris (Seattle Genetics and Millennium, Takeda) on antikeha ja ravimi konjugaat, mis koosneb CD30-vastasest monoklonaalsest antikehast, mis on kovalentselt seotud mikrotoubulitevastase aine monometüülauristatiin E-ga. Adcetris on näidustatud Hodgkini lümfoomi ja refraktoorse süsteemse anaplastilise suurearakulise lümfoomi raviks täiskasvanud patsientidel. Trastuzumabemtansiin (Kadcyla, Genentech ja Roche) koosneb trastuzumabist (inimesele omaseks muudetud HER2-vastane monoklonaalne antikeha) ja sellega kovalentselt seotud mikrotoubulite inhibiitorist DM1-st. Trastuzumabemtansiin on näidustatud HER2-positiivse, mitterekteeritava lokaalselt kaugelearenenud või metastaatilise rinnanäärmevähi raviks. Lisaks neile kahele FDA heakskiidetud ADC-le on *clinicaltrials.gov* avaldanud andmed, mille järgi on kliinilistes ravimiuuringutes testimisel veel üle 40 antikeha ja ravimi konjugaadi ning sajad ADCd on väljaarendamisel prekliinilistes uuringutes.

Antikehade laialdane populaarsus vähiravi kullermolekulidena tuleneb kliiniliselt valideeritud terapeutiliste antikehade (Herceptin, Avastin) kättesaadavusest ja suurest kommertsiaalsest edust. Kuigi antikehad ja nende fragmendid seonduvad sihtmärkidega spetsiifiliselt ja suure afiinsusega, on nende puuduseks suurus ja sellest tingitud vähene võime sügavamale kasvajakoesse tungida ning samuti teatud juhtudel ilmnev immunogeensus (13, 14). Peptiididel ja nukleiinhapete aptameeridel on võrreldes antikehadega afiinsusligandidena mitmeid eeliseid: nende väiksus võimaldab paremat kudede läbimise võimet ning enamasti ei ole nad immunogeensed (15, 16). Võrreldes antikehadega on peptiidide ja aptameeride tootmine odav. Peptiidide ja aptameeride antikehadega võrreldes madalat afiinsust märklaudmolekulide suhtes on võimalik suurendada nende korduste arvu suurendamise läbi. Peptiidide ja aptameeride stabiilsust saab omakorda suurendada mittematuraalsete aminohapete ning nukleotiidide lisamisega ning meetodid diagnostiliste ja terapeutiliste molekulide konjugeerimiseks mõlemat tüüpi kullermolekulidega on hästi välja töötatud (16, 17).

KASVAJATE SIGNATUURMOLEKULIDE LEIDMINE FAAGIDISPLEI ABIL

Suunatud vähiravi väljatöötamisel on suuri maks väljakutseks identifitseerida vähile iseloomulikud ja vereringest ligipääsetavad signatuurmolekulid. Selleks pole võimalik kasutada ekspresioonianalüüside andmeid, kuna paljud vähikoos üleekspresseeritud molekulid paiknevad raku sisemuses ja/või on süsteemset mitteligipääsetavad. Sobivate signatuurmolekulide väljasõelamiseks ehk skriinimiseks töötas Erkki Ruoslahti juhitud uurimisrühm USAs 1990ndate lõpus välja *in vivo* bakteriofaagidisplei meetodi, mis põhineb bakteriofaagi peptiidiraamatukogude kasutamisel (vt joonis 1) (18). Bakteriofaagide (bakteriiviruste) pinnavalke on võimalik geneetiliselt muuta, lisades looduslikule kapsiidi-valgule juhusliku peptiidijärjestuse. Nii on võimalik tekitada miljardeid erinevaid peptiidijärjestusi kandvatest faagidest koosnevaid nn peptiidi-faagiraamatukogusid. Sellise faagiraamatukogu süstimine kasvajaga katselooma vereringesse ning hilisem kasvajakoe ja kontrollkudede

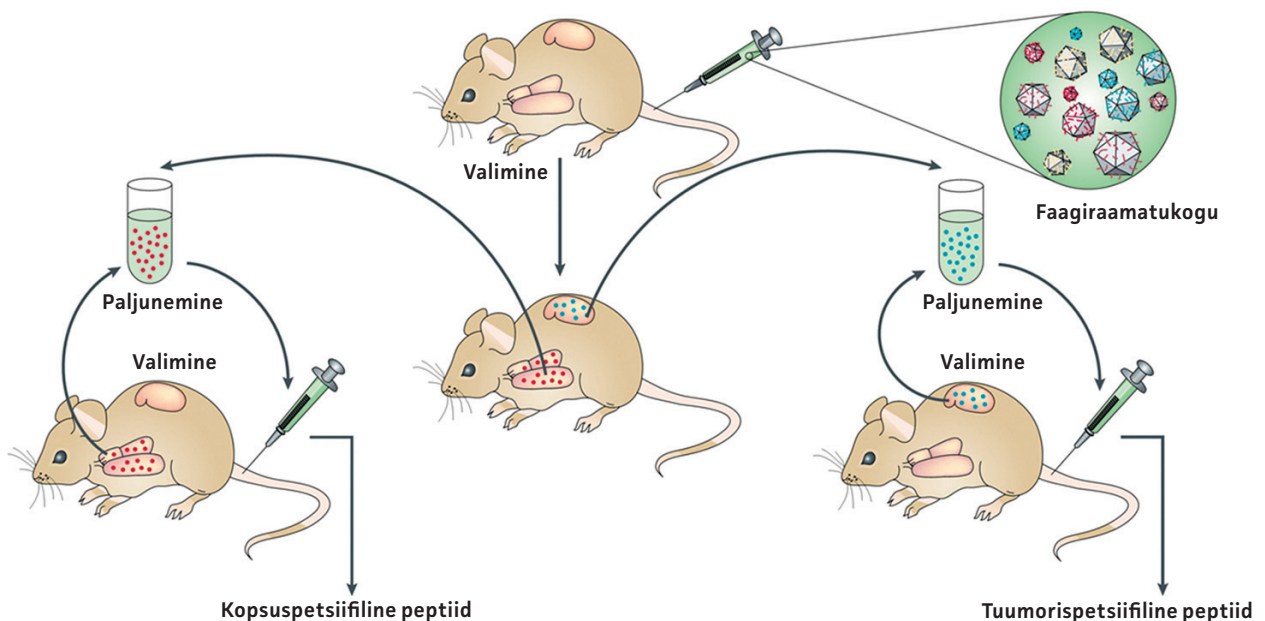
võrdlev analüüs võimaldab leida kasvajakoe suhtes selektiivse peptiidjärjestuste valimi ning erinevate biokeemiliste analüüsidega on võimalik identifitseerida kullerpeptiidide märklaudmolekule (17, 19, 20). Kuna sarnaselt ravimiga n-õ näeb tsirkuleeriv faag ainult süsteemselt ligipäsetavaid vähimolekule, on selliselt leitud peptiidid või märklaudmolekulid rakendatavad ravimite suunamiseks. Lisaks on peptiidide märklaudmolekule võimalik kasutada täiendavate afiinsusligandide (antikehad, aptameerid, täiendavad peptiidid või erinevad sünteetilised molekulid) arendamiseks.

Vähispetsiifilised kullerpeptiidid

RGD-peptiidid. *In vivo* faagidisplei abil leitud vähiselektiivsete peptiidide enim uuritud näiteks on arginiin-glütsiin-aspartaat-(RGD-) motiivi sisaldavad peptiidid (21). Paljudes ekstratsellulaarse maatriksi valkudes (nt fibronektiinis ja vitronektiinis) esinev RGD-motiiv seondub rakupinna adhesioonimolekulide integriinidega ja on seega võtmetähtsusega rakumaatriksi interaktsioonide jaoks. Integriinid on heterodimeersed rakkude pinnalvalgud, mis lisaks ankurvalkudena toimimisele osalevad signaaliradade moduleerimisel.

Integriinide α ja β subühikute kombineerimisel tekib 24 heterodimeerset kompleksi, millel on erinevad seostumiseelised RGD-motiiviga külgnevate aminohapete suhtes. Integriinide ekspressioon on täpselt reguleeritud ning sõltub koest, rakutüübist, lokaliseerimisest ja füsioloogilisest staatusest. Näiteks αv integriinid ($\alpha v \beta 3$ ja $\alpha v \beta 5$) on üleekspressioonitud kasvavates ja arenevates normaalsetes kudedes, vähikoos ja angiogeensete veresoonte pinnal (8, 22). Täiskasvanud organismis võib αv integriine pidada vähikoe signatuurmolekulideks.

RGD peptiidimotiivi kui vähi suunavat järjestust on prekliiniliselt põhjalikult uuritud. RGD-motiivi selektiivsus ja võime jõuda kasvajani säilib ka siis, kui peptiidiga on liidetud terapeutilised või diagnostilised ühendid, näiteks pro-apoptoetilised (programmeeritud rakusurma põhjustavad) peptiidid, erinevad kemoterapeutikumid, vaigistavat RNAd kandvad nanoosakesed ning diagnostilised raudoksiidi nanoosakesed (23, 24). Lisaks toimimisele kullermolekulina on mõned RGD-peptiidid otsese vähivastase toimega. Näiteks põhjustab modifitseeritud tsükliline CRGDC pentapeptiid Cilengitide ($\alpha v \beta 3$ ja $\alpha v \beta 5$ integriinide antagonist) kasvajate loomudelitel maliigsete rakkude



Joonis 1. *In vivo* bakteriofaagidisplei kasutamine indentifitseerimaks erinevate kudede suhtes spetsiifilisi peptiide. Kasvajaga katselooma vereringesse süstitakse faagiraamatukogu, seejärel tuumorikude ja kontrollkoed eraldatakse ning neisse kogunenud faagid paljundatakse. Paljundatud faagidega lahus süstitakse järgmisesse katselooma, mille järel toimub taas kudede eraldamine ja seal olevate faagide paljundamine ehk järgmine selektsiooniring. Nii toimitakse mitu korda, et jõuda koospetsiifiliste faagide rikastumiseni. Viimase selektsiooniringi järel analüüsitakse huvipakkuvasse koosse kogunenud faagid ning tehakse kindlaks peptiidjärjestused, mida nad kandsid. Enim esinenud peptiid(id) on vastava koe spetsiifilised ja kasutatavad kullermolekulidena sihtmärgistatud ravis (8).

apoptoosi ja inhibeerib tuumori kasvu (25). Cilengitide'i vähivastasest aktiivsusest ei pruugi siiski piisata terapeutiliseks efektiks patsientidel. Hiljuti avaldatud III faasi ravimikatsetustes leiti, et vaatamata uuringute I ja II faasi lootustandvatele tulemustele ei võimenda Cilengitide temosolomiidi kasvaja vastast toimet glioblastoomis (26).

CD13-ga seonduvad peptiidid. NGR-motiivi sisaldavad peptiidid on esimese põlvkonna vähiselektiivsete peptiidide teiseks bakteriofaagi displei meetodil avastatud ja enim uuritud peptiidide perekonnaks. See peptiid tunneb ära angiogeensetel veresoontel ekspresseeritud metalloproteinaasi aminopeptidaasi N (CD13). Lisaks kasvaja endoteelirakkudele ja peritsüütidele ekspresseerivad seda ensüümi ka mitmed normaalsed koed (peensoole epiteel, eesnääre, neeru proksiimaaltuubulid jt), kuid on leitud, et tsükliline CNGRC seondub ainult kasvaja veresoontega ja mitte teiste CD13-positiivsete kudedega (27). Sarnaselt RGD-motiiviga on NGR-peptiid näidanud prekliinilistes katsetes erinevate terapeutiliste ühendite kasvajasse toimetamise võimet. Tuumorinekroosifaktoriga liidetud NGR (NGR-hTNF) on terapeutilise ühendina läbinud kliiniliste katsetuste I ja II faasi, kus ühendi efektiivsust testiti nii monoterapias kui ka koos erinevate kemoterapeutikumidega erinevatel pahaloomulistel kasvajatel ning mõnevõrra üllatuslikult leiti, et suurem ravivastus ilmneb ühendi väiksemate kontsentratsioonide korral (27). Saadud tulemused lubasid 2010. aastal alustada III faasi katsetustega pleura pahaloomulise mesotelioomi ravis. 2014. aasta ASCO (American Society of Clinical Oncology) kongressil avaldatud vaheandmete põhjal pikendab NGR-hTNF mesotelioomipatsientide elulemust võrreldes kontrollrühma patsientidega ligi poole võrra (16,5 kuud NGR-hTNF-i ja 9,8 kuud kontrollrühma korral).

Koagulatsioonisüsteemiga interakteeruvad peptiidid. Kliinilisest vaatepunktist võivad perspektiivi omada ka hüübimist indutseerivad ja trombidega seonduvad peptiidid. Soliidtuumorite üheks omaduseks on hüperkoagulatsiooniline staatus ja trombide teke. Faagidisplay abil on leitud kolm peptiidi, mis seonduvad soliidtuumorites selektiivselt trombidega: CLT1, CLT2 ja CREKA (28, 29). Kõik kolm peptiidi lokaliseeruvad vaid kasvajas või vigastatud kudedes,

jättes terved koed puutumata (28, 29). CREKA-peptiid konjugeerituna raudoksiidi nanoosakestele suudab lisaks nende agregaatidega seondumisele indutseerida täiendavat hüübimist – tegu on iseamplifitseeruva süsteemiga. CREKA-peptiidiga kaetud nanoosakesi on testitud võimaliku ühendina, mis trombide tekke kaudu pärsiks kasvaja arengut, ja on leitud, et erinevatel hiiremudelitel suudavad hüübimist indutseerivad ühendid kasvaja arengut aeglustada (29, 30). Samas on trombide lokaalne tekitamine süsteemselt manustatud ühendi läbi seotud väga suurte riskidega.

Vähki penetreerivad peptiidid

Kasvaja veresoonte ja kasvajarakkudega seonduvate peptiidide, antikehade ja aptameeride oluliseks puuduseks on võimetus veresoontest kasvajakoesse tungida (31). Tavapäraselt on ravimid võimelised veresoontest nende all olevatesse kudedesse liikuma vaid 3–5 rakukihi sügavusele. Kaugemal olevate vähirakkudeni jõuab ravimidoos, millel puudub vähivastane toime ja mis soodustab ravimiresistentsuse väljakujunemist (32). Tuumoritele iseloomulikud kõrge interstitsiaalne rõhk ja lümfipuudulikkus raskendavad ravimite difusiooni kudedesse veelgi (33).

Meie rühma osalusel hiljuti avastatud ja iseloomustatud vähki penetreerivad peptiidid (*tumor penetrating peptides*, TPP) mitte üksnes ei seostu angiogeensete vähiveresoontega, vaid väljuvad neist (ekstravaseeruvad) ja tungivad sügavale vähikoe parenhüümi (20, 31). TPPd suurendavad vähiravimitega keemiliselt konjugeerituna või ka lihtsalt koosmanustatuna ravimite selektiivset akumulatsiooni ja ekstravasatsiooni kasvaja-, kuid mitte normaalsetes kudedes (34). TPPd koosnevad mitmest erinevast funktsionaalsest moodulist. Sarnaselt konventsionaalsete kullerpeptiididega sisaldavad TPPd aminohappelist järjestust, mis seostub vähiveresoontes üleekspresseeritud rakupinna molekulidega. TPPde unikaalsed kude penetreerivad omadused tulenevad peptiidijärjestuses sisalduvast nn C-endR-motiivist (*C-end Rule*), mis pärast kasvajakoes toimuvat proteolüütilist aktivatsiooni seostub endoteelirakkudel ekspresseeruva neuropiliin-1-ga (NRP-1), põhjustades selektiivset tuumoriveresoonte lekkimist ja koepenetratsiooni (vt joonis 2) (20).

Praeguse prototüüpse TPP – iRGD – esmasseks retseptoriks on vähikoe endoteelirak-

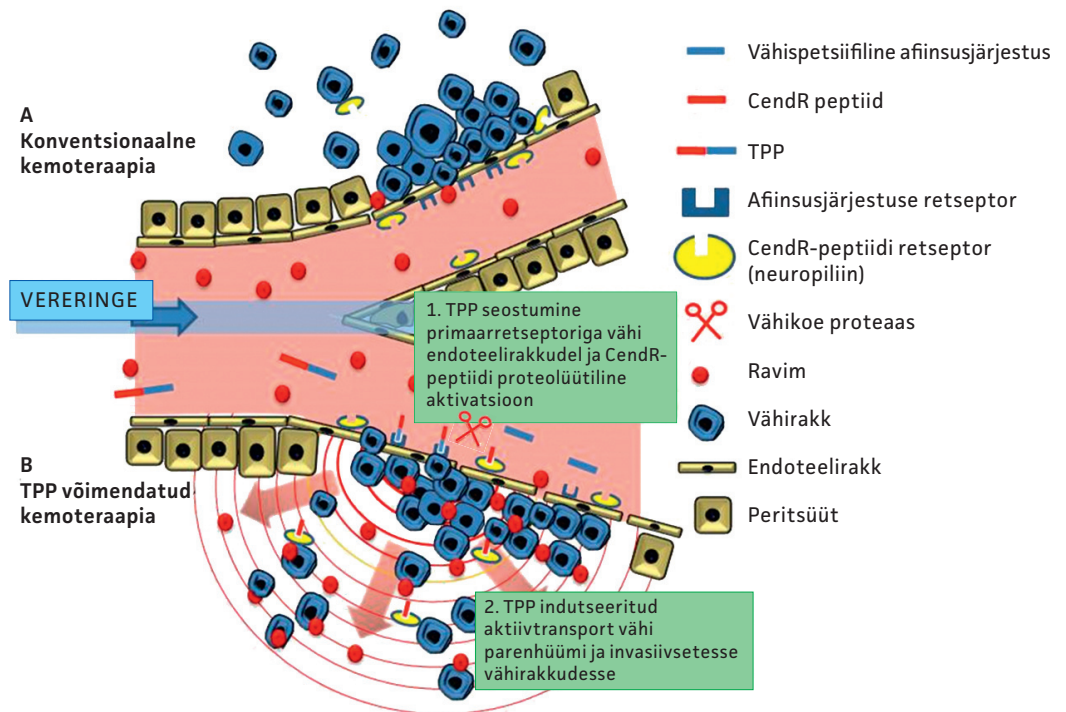
kudel ekspresseeruvad angiogeensed integriinid. Meie avaldamata andmed näitavad, et TPPs leiduvaid funktsionaalseid mooduleid (afinsusjärjestus, proteaasi lõikesait, CendR-i element) on võimalik ümber korraldada selliselt, et tulemuseks on muudetud spetsiifilisusega vähki penetreerivad peptiidid. Kuna koopenetratsioonireseptor neuropiliin ekspresseerub ka normaalsete kudede veresoontes, on võimalik, et CendR-i koopenetratsiooni saab kasutada ekstravaskulaarseks ravimite transpordiks ka mittemaliigsete haiguste puhul.

Paljud laborid üle maailma on juba edukalt kasutanud iRGD-d prekliinilites uuringutes ravimite, kontrastainete ning nanoosakeste maliigsetesse kudedesse viimiseks (35–38). Võimalike kliiniliste rakenduste jaoks on vajalik, et CendR-i järjestuse koopenetratsiooni mehhanism poleks liigspetsiifiline ja toimuks inimese maliigsetes kudedes. Seda eeldust toetavad hiljutised *in vitro* katsed (nn *tumor dipping assay*) värskest resekteeritud kliinilise soolevähi eksplantaatidega, milles selgus, et iRGD vallandab nendes proovides (sarnaselt hiire

ksenograftidega) angiogeensetest integriinidest ja neuropiliinist sõltuva vähipenetratsiooni (Sugahara, Teesalu jt, avaldamata andmed). Praegu on prioriteediks iRGD vähiselektiivsuse ja koopenetratsioonivõime kinnitamine kliinilistes ravimiuuringutes. Lisaks biotehnoloogia- ja farmaatsiafirmades aset leidvale tegevusele loodame ka Eestis käivitada uuringuid, et hinnata iRGD-l põhinevaid suunatud teraapiaid.

KOKKUVÕTE

Kemoterapeutikumide vähene selektiivsus vähirakkude suhtes tingib suurte dooside vajalikkuse ja sellest tuleneva väga tugeva toksilisuse organismi mittemaliigsetele rakkudele. Peptiidised vähikoetspetsiifilised afinsusligandid seonduvad kasvajaveresoontega ning aitavad vähiravimite selektiivsust parandada. Vähki penetreerivad peptiidid võimaldavad ravimite levimist veresoontest välja ning nende akumulatsiooni sügaval vähikoe parenhüümis. Vähki penetreerivad peptiidid suurendavad lühiajaliselt vähiveresoonte läbilaskvust, suurendades kaasmanustatud ravimite akumulatsiooni



Joonis 2. Tuumorit penetreerivate peptiidide (TPP) kasutamine ravimite selektiivseks vähikoosse viimiseks.

A. Konventsionaalse kemoterapia puhul on ravimite levik veresoontest vähikoosse väheefektiivne. Selle kompenseerimiseks tuleb tsütotoksilisi ravimeid kasutada kogustes, mis põhjustavad kõrvalnähte ka normaalsetes kudedes. B. TPPd põhjustavad vähi veresoonte lekkimist, võimaldades ravimitel (sh nanoosakestel või kontrastainetel) tungida sügavamale vähikoosse. TPP aktiveerimine toimub läbi mitmeastmelise protsessi (seostumine veresoonte seinaga, CendR-peptiidi proteolüütiline aktiveerimine, aktiveeritud CendR-peptiidi seostumine ja koesse sisenemine).

ja terapeutilist efektiivsust vähikoos. Pärast edukat kliinilist validatsiooni võib sellest kujuneda vähiravimite toimet võimendav ja kõrvalnähte vähendav universaalne platvorm – alati sihtmärgini jõudev hõbekuul.

SUMMARY

Silver bullets in cancer therapy – towards targeted cancer management

Hedi Hunt¹, Pille Säälük¹, Kadri Toome¹, Artur Vetkas², Andres Asser³, Tõnu Rätsep², Toomas Asser², Tambet Teesalu¹

One of the main challenges of oncology is to develop tumour-selective cancer therapeutics with increased potency and decreased side effects on normal organs. This review summarizes past research and current trends in development of affinity targeted cancer therapeutics.

Tumour blood vessels are molecularly different from normal blood vessels. Peptide phage display screens can be used to identify homing peptides that bind to specific targets in the tumour vasculature. Corresponding synthetic peptides (and other ligands that bind to tumour specific vascular signature molecules such as antibodies and aptamers) are used for targeting low molecular weight drugs, biologicals and nanoparticle drugs into tumours to increase their therapeutic index. Molecular interactions that drive the specificity and activity of tumour-specific targeting ligands continue to be intensively investigated. An emerging class of tumour specific targeting ligands, Tumour Penetrating Peptides, trigger bulk extravascular transport in the tumour tissue and can be used for increasing the therapeutic efficacy of unmodified cancer drugs.

KIRJANDUS/REFERENCES

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96.
2. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7:392–401.
3. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58–62.
4. Ariffin A. Releasing Pressure in tumors: what do we know so far and where do we go from here? A review. *Cancer Res* 2014;74:2655–62.
5. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert A. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine* 2014;10:19–34.
6. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;66:2–25.

7. Koren E, Torchilin V. Drug carriers for vascular drug delivery. *IUBMB Life* 2011;63:586–95.
8. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nature reviews. Cancer* 2002;2:83–90.
9. Somani R, Bhanushali U. Targeting angiogenesis for treatment of human cancer. *Indian J Pharm Sci* 2013;75:3–10.
10. Ruoslahti E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol* 2000;10:435–42.
11. Pasqualini R, Moeller B, Arap W. Leveraging molecular heterogeneity of the vascular endothelium for targeted drug delivery and imaging. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:343–51.
12. Joyce J, Laakkonen P, Bernasconi M, Bergers G, Ruoslahti E, Hanahan D. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003;4:393–403.
13. Adams G, Weiner L. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005;23:1147–57.
14. Trail P, King H, Dubowchik G. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:328–37.
15. Li Z, Cho C. Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery. *J Transl Med* 2012;10 Suppl 1.
16. Teesalu T, Sugahara K, Ruoslahti E. Mapping of vascular ZIP codes by phage display. *Meth Enzymol* 2012;503:35–56.
17. Ruoslahti E, Bhatia S, Sailor M. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol* 2010;188:759–68.
18. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364–6.
19. Laakkonen P, Zhang L, Ruoslahti E. Peptide targeting of tumor lymph vessels. *Ann NY Acad Sci* 2008;1131:37–43.
20. Teesalu T, Sugahara K, Kotamraju V, Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16157–62.
21. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998;279:377–80.
22. Weis S, Cheresh D. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011;17:1359–70.
23. Laakkonen P, Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integr Biol (Camb)* 2010;2:326–37.
24. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010;148:135–46.
25. Buerkle M, Pahernik S, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer* 2002;86:788–95.
26. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1100–8.
27. Corti A, Curnis F, Rossoni G, Marcucci F, Gregorc V. Peptide-mediated targeting of cytokines to tumor vasculature: The NGR-hTNF example. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2013.
28. Pilch J, Brown D, Komatsu M, Järvinen T, Yang M, Peters D, et al. Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2800–4.
29. Simberg D, Duza T, Park J, et al. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:932–6.
30. Agemy L, Sugahara K, Kotamraju V, Gujrati K, Girard O, Kono Y, et al. Nanoparticle-induced vascular blockade in human prostate cancer. *Blood* 2010;116:2847–56.
31. Sugahara K, Teesalu T, Karmali P, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 2009;16:510–20.
32. Hambley T, Hait W. Is anticancer drug development heading in the right direction? *Cancer Res* 2009;69:1259–62.
33. Mehra N, Mishra V, Jain N. Receptor-based targeting of therapeutics. *Ther Deliv* 2013;4:369–94.
34. Sugahara K, Teesalu T, Karmali P, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 2010;328:1031–5.
35. Dai W, Fan Y, Zhang H, Wang X, Zhang Q, Wang X. A comprehensive study of iRGD-modified liposomes with improved chemotherapeutic efficacy on B16 melanoma. *Drug Deliv* 2015;22:10–20.
36. De G, Ko JK, Tan T, Zhu H, Li H, Ma J. Amphipathic tail-anchoring peptide is a promising therapeutic agent for prostate cancer treatment. *Oncotarget* 2014;5:7734–47.
37. Wang K, Zhang X, Liu Y, Liu C, Jiang B, Jiang Y. Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates. *Biomaterials* 2014;35:8735–47.
38. Sugahara KN, Braun GB, de Mendoza TH, et al. Tumor-Penetrating iRGD Peptide Inhibits Metastasis. *Mol Cancer Ther* 2015;14:120–8.

¹ Laboratory of Cancer Biology, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia;
² Department of Neurology and Neurosurgery, University of Tartu, Tartu, Estonia;
³ North Estonia Medical Centre, Tallinn, Estonia

Correspondence to: Tambet Teesalu
 tteesalu@ut.ee

Keywords: peptide, targeted cancer therapeutics, chemotherapy, cancer