

Pre-clinical development of anginex and design of small-peptide mimetics

Citation for published version (APA):

Dings, R. P. M. (2003). *Pre-clinical development of anginex and design of small-peptide mimetics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030703rd>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20030703rd](https://doi.org/10.26481/dis.20030703rd)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary / Samenvatting

Summary

The process of generating new blood vessels from pre-existing vasculature is termed angiogenesis. Angiogenesis takes place in several developmental stages and multiple physiological and pathological processes. One of those pathological processes is cancer. Chapter 1 gives a general introduction to the field of cancer related angiogenesis and to the plethora of molecules involved in it. Until now many of angiogenesis inhibitors have been derived from endogenous origins. However, the emphasis of this thesis lies on the design and development of new exogenous angiogenesis inhibitors. These inhibitors were designed using a combinational approach employing basic folding principles and incorporating short sequences from β -sheet domains. This approach generated a library of peptides that were tested for their anti-angiogenic capacity. One peptide shown to be most potent, β -pep25, was named anginex. Anginex is a 33mer whose structure was based on the 3D structure of α -chemokines such as platelet factor-4 and interleukin-8 and the β -sheet domain containing molecule bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI). Chapter 2 describes that the anti-angiogenic capacity of anginex is also present *in vivo* and that anginex can inhibit tumor growth in a human ovarian carcinoma xenograft model. Various treatment regimes, the mode and frequency of administration, as well as dose response curves, were investigated and continuous systemic treatment in a 10 mg/kg/day dose provided optimal efficacy. This was improved by conjugating anginex to human serum albumin to enhance its bioavailability, which led to 75% tumor growth inhibition even 30 days post-treatment. Chapter 3 shows that besides the human ovarian xenograft model anginex also entails anti-tumor activity in a murine syngeneic carcinoma model (B16F10 melanoma in C57BL/6 mice). The absence of toxicity in all of the models used, indicates that anginex is a very promising anti-cancer agent that should be developed for clinical testing. The mechanistic studies (both *in vitro* as well as *in vivo*) described in chapter 3 showed that anginex exerts its anti-angiogenesis effect by specifically targeting tumor endothelial cells.

Besides testing anginex as a mono-therapeutic agent, it was also investigated in combination with conventional chemotherapy or the well-known angiogenesis inhibitor angiostatin. As described in chapter 4, the combination of anginex with a sub-optimal dose of chemotherapeutic carboplatin resulted in tumor remissions to microscopic disease. Treatment in combination with angiostatin demonstrated a synergistic effect at inhibiting tumor growth. Immunohistochemical assessment of the microvessel density indicated that this tumor growth inhibition by anginex is explained by its anti-angiogenic activity. In addition, an increase in apoptotic cells and a decrease in proliferating cells was noticed in anginex treated tumors compared to vehicle treated tumors.

By generating a new series of anginex related molecules the structural bioactive conformation of anginex was investigated, which is described in chapter 5. This series of molecules were modified by excluding 6 amino acids of the C-terminus of anginex and by introducing disul-

fide bonds. These covalent constraints limited conformational space available to the peptide, such that, for example, helix formation could not occur. As long as placement of disulfide bonds preserved the β -strand alignment as in the proposed bioactive conformation, activity was preserved.

Based on further structure-activity relationships of these β -sheet-forming peptides, partial mimetics were designed. In order to maintain the β -sheet conformation a dibenzofuran turn-mimetic was introduced, as described in chapter 6. One of these novel anti-angiogenic molecules, 6DBF7, was more effective *in vivo* than parent anginex. In a mouse xenograft model for ovarian carcinoma, 6DBF7 was observed to reduce tumor growth by up to 80%. Because *in vitro* tube formation was inhibited by 6DBF7 and treatment of tumor-bearing mice resulted in a significant reduction in microvessel density within the tumor, it was suggested that the mechanism of 6DBF is also based on angiogenesis inhibition. This partial peptide-mimetic is the first molecule designed as a substitute for an angiogenesis inhibitory agent.

Chapter 7 reviews the current anti-angiogenesis peptides and their diversity in methods of identification. In addition, commonalities were addressed in this chapter, followed by possible future directions.

Samenvatting

De vorming van nieuwe bloedvaten uit reeds bestaande bloedvaten in het lichaam noemt men angiogenese. Naast een belangrijke rol in de embryonale fase, speelt angiogenese een essentiële rol tijdens fysiologische en pathologische processen. Een voorbeeld van zo'n pathologische conditie is kanker. Een algemene introductie over kankergeassocieerde angiogenese staat beschreven in hoofdstuk 1. Angiogeneseremming biedt een unieke kans om tumorgroei tegen te gaan en is gebaseerd op andere principes dan de traditionele behandelingsmethoden zoals chirurgie, bestraling en chemotherapie. Anti-angiogenese therapie beïnvloedt de bloedvaten in tegenstelling tot de conventionele therapieën die meestal gericht zijn tegen de tumorcellen zelf. De meeste tot nu toe beschreven angiogeneseremmers zijn van endogene afkomst. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van specifieke exogene remmers. Deze remmers werden gecreëerd aan de hand van de 3-dimensionale structuur van β -sheet bevattende cytokines zoals plaatjesfactor-4 en interleukine-8. Tevens hebben deze 33 aminozuren bevattende peptiden β -sheet gedeeltes van bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). Bij deze toepassing is een bibliotheek van peptiden gegenereerd, welke getest werd op anti-angiogene activiteit. Eén van deze peptiden, β pep-25, bleek de grootste *in vitro* angiogenese remmende activiteit te bezitten en werd geselecteerd voor verdere ontwikkeling. β pep-25 kreeg de naam anginex.

Hoofdstuk 2 beschrijft dat deze anti-angiogene werking van anginex ook *in vivo* wordt waargenomen en dat deze werking de remming van tumorgroei kan bewerkstelligen. Verschillende doseringen en behandelingschema's werden onderzocht. Een continue systemische behandeling met een concentratie van 10 mg/kg/dag resulteerde in een optimaal effect. Dit werd waargenomen in een humaan ovariumcarcinoom model in naakte muizen. De tumorgroei remming bleek vergroot te kunnen worden door anginex te koppelen aan humaan serum albumine. Dit leverde een inhibitie op van 75% tot zelfs 30 dagen na het einde van de behandeling. Hoofdstuk 3 laat zien dat naast een goede werking in het ovariumcarcinoom model, anginex ook in staat is tumorgroei te remmen in een syngene muismodel (B16F10 melanoom in C57BL/6 muizen). Het uitblijven van enige vorm van toxiciteit in alle geteste muismodellen, suggereert dat anginex een veelbelovend medicijn tegen kanker kan worden. De mechanistische studies (*in vitro* en *in vivo*) in hoofdstuk 3 laten zien dat anginex specifiek werkt via het endotheel van de tumoren.

Naast het testen van anginex als monotherapie zijn er ook combinatietherapieën uitgevoerd. Hoofdstuk 4 beschrijft de combinatie van anginex met traditionele chemotherapie en een andere bekende angiogeneseremmer angiostatine. De combinatie behandeling met chemotherapeutica, zoals de platina-verbinding carboplatin, liet een complete remissie van de tumoren zien. De combinatie therapie met angiostatine liet een synergistisch effect zien met betrekking tot het remmen van tumorgroei. De tumorgroei remming werd verklaard door een vermindering van het aantal capillaire bloedvaten in de tumor. Dit werd aangetoond met behulp

van immunohistochemische experimenten. Deze proeven lieten tevens zien dat er een verhoogd aantal cellen apoptose onderging en een verlaagd aantal prolifererende cellen aanwezig was in tumoren die behandeld waren met anginex, in vergelijking met controle tumoren.

De bio-actieve structuur van anginex werd onderzocht met behulp van de nieuw-ontwikkelde anginex gerelateerde moleculen die beschreven staan in hoofdstuk 5. Een nieuwe serie peptiden werd gesynthetiseerd waarbij zes C-terminale aminozuren werden verwijderd en zwavelbruggen werden geïntroduceerd om de vouwvrijheid van het peptide te belemmeren. Indien de plaats van een zwavelbrug de β -sheet structuur waarborgde - de veronderstelde bioactieve conformatie - bleef de anti-angiogene activiteit behouden.

Aan de hand van additionele structuur-activiteit proeven met anginex werden gedeeltelijke mimetics ontworpen. Om de bio-actieve β -sheet structuur te handhaven, werd een dibenzofuran-groep (DBF) geïntroduceerd. Deze dibenzofuran-groep is beschreven als 'turn-mimetic'. Deze studies staan vermeld in hoofdstuk 6. Eén van deze gegenereerde moleculen, 6DBF7, was in *in vivo* tumor modellen effectiever dan anginex. In het hiervoor genoemde humaan ovariumcarinoom muismodel was 6DBF7 in staat om 80% van de tumorgroei te remmen. Als gevolg van toediening van 6DBF7 werd een vermindering in de *in vitro* spruitformatie waargenomen en bleek de microvaatdichtheid in muizentumoren sterk afgenomen. Dit suggereert dat angiogenese remming ook ten grond slag ligt aan de tumorgroei remming van 6DBF7. Deze 'partial mimetic' is de eerst rationeel ontworpen substitutie voor een angiogene remmer. 6DBF7 is maar half zo groot als anginex en met een behouden dan niet vermeerderde tumorremmende activiteit, is dit een hoopvolle ontwikkeling op de weg naar een 'small-molecule' angiogeneseremmer.

Een samenvatting van de enkele nu bekende angiogenese remmers staan beschreven in hoofdstuk 7. In dit hoofdstuk worden de overeenkomsten van de verschillende remmers besproken en de toekomstverwachtingen in het kanker gerelateerde angiogeneseonderzoek. Tevens worden in dit hoofdstuk de nieuwe technieken vermeld die gebruikt worden om meer en betere angiogenese remmers te ontdekken en verder te ontwikkelen, in de hoop een nieuwe krachtige behandelmethodiek te ontwikkelen naast de reeds bestaande geaccepteerde therapieën.