

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Ocena profilu farmakokinetycznego biokoniugatów przeciwnowotworowych nowej generacji w badaniach *in vivo*”

2. Czas trwania projektu: 4 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): biokoniugaty, terapia antynowotworowa, profil farmakokinetyczny.

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych). **F**- Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania.

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Celem prowadzonych badań jest opracowanie nowych biokoniugatów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Biokoniugaty mają selektywnie docierać do komórek nowotworowych, pozostając bezpiecznymi dla komórek zdrowych.

Opracowywane biokoniugaty to cząsteczki składające się z białkowego nośnika oraz związku drobnocząsteczkowego połączonych linkerem chemicznym. Wymagania stawiane nośnikowi to silne powinowactwo do struktur występujących na powierzchni komórek nowotworowych. Z założenia nośnik taki nie powinien oddziaływać z komórkami prawidłowymi organizmu, co ma ograniczyć efekty uboczne terapii. Z kolei dołączony do nośnika za pomocą linkera chemicznego związek drobnocząsteczkowy powinien posiadać silne działanie cytotoksyczne/cytostatyczne. Degradowany linker pozwala na uwolnienie związku w rejonie guza lub wewnątrz komórek nowotworowych – po wcześniejszej internalizacji biokoniugatu.

Może się zdarzyć, że w wyniku prowadzonych badań opracowany zostanie nośnik białkowy, który oprócz zdolności rozpoznawania komórek nowotworowych, będzie blokował przekazywanie sygnałów proliferacyjnych, a nawet indukował sygnał prowadzący do śmierci komórki (apoptozy). Taki nośnik będzie mógł być badany samodzielnie, jako że może być oryginalną substancją terapeutyczną.

Efektem projektu ma być wytypowanie cząsteczek terapeutycznych, docelowo biokoniugatów, do fazy badań toksykologicznych oraz klinicznych.

Na opracowanie biokoniugatu składa się szereg etapów zaczynając od projektu cząsteczki i symulacji komputerowych, przez syntezę genu, konstrukcję plazmidu, hodowlę bakteryjną, izolację i oczyszczenie białka, koniugację z efekтором, analitykę, testy *in vitro* na panelu linii komórkowych, kończąc na testach *in vivo* z wykorzystaniem myszy i szczurów.

Do wstępnych badań na zwierzętach planowane jest wyselekcjonowanie około 40 cząsteczek, w tym biokoniugaty jak i same nośniki białkowe o aktywności przeciwnowotworowej, które pomyślnie przejdą testy wiązania z celowaną strukturą zewnątrzkomórkową oraz będą efektywne w warunkach *in vitro*.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Myszy – 384

Szczury – 180

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

Pubmed; ScienceDirect; ClinicalTrials.gov; GlobalData HealthCare service; Medtrack service.

Wykorzystałam/Wykorzystałem słowa kluczowe:

Bioconjugates AND cancer / targeted therapy / EGFR targeting AND cancer / HER2 targeting AND cancer / ErbB3 targeting AND cancer / ErbB4 targeting AND cancer / anti-EGFR agents / anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors / anti-EGFR monoclonal antibodies / IGF-R1 targeting / IGF-R1 AND cancer / cytotoxic drugs /

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że prowadzony przez Adamed projekt rozwoju biokoniugatów o działaniu przeciwnowotworowym jest innowacyjny i w pełni zasadny.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że obecnie panuje trend w kierunku badań nad bezpiecznymi terapiami przeciwnowotworowymi, które w przeciwieństwie do klasycznej chemioterapii pozwolą na ograniczenie efektów ubocznych. Przykładem cząsteczek, które wpisują się w ten trend są właśnie biokoniugaty, które wnioskodawca opracowuje w ramach projektu o akronimie BIOCON. Główną składową biokoniugatów jest nośnik białkowy, który specyficznie ma rozpoznawać miejsca zmienione nowotworowo. Wnioskodawca za cel molekularny obrał między innymi receptory z rodziny HER. Receptory te są jednymi z lepiej poznanych i opisanych w literaturze. Są znanym celem molekularnym dla wielu zatwierdzonych do użytku leków, takich jak: afatinib, erlotinib, gefitinib czy osimertinib (inhibitory kinaz), a także cetuximab, panitumumab czy necitumumab (przeciwciała monoklonalne). Niestety, liczba pacjentów, u których z powodzeniem zastosowano terapię z wykorzystaniem wspomnianych leków, jest cały czas niezadowalająca. Szacuje się, że na leczenie odpowiada ok. 10% pacjentów. Spowodowane to jest między innymi występowaniem różnych mutacji receptora, w tym mutacji nabywanych w trakcie terapii. Niezbędnym wydaje się poszukiwanie nowych cząsteczek, które będą w stanie przełamać oporność komórek nowotworowych i nie będą powodować efektów ubocznych. Mając na uwadze obecny status leków przeciw receptorowi EGFR i coraz większą wiedzę na temat oporności, można utwierdzić się w przekonaniu, że Wnioskodawca właściwie wytypował cele molekularne i obrał słuszny kierunek badań.

Wartym podkreślenia jest, że Wnioskodawca w wyniku zgromadzenia wiedzy o terapiach przeciwnowotworowych z wykorzystaniem cząsteczek skierowanych na receptor EGFR napisał pracę przeglądową, w której wnikliwie opisuje receptor EGFR, jako potencjalny cel molekularny (R.Kwapiszewski, *et al.* Anti-EGFR agents: current status, forecasts and future directions. Targeted Oncology (2016); DOI: 10.1007/s11523-016-0456-3).

Brak jest danych dotyczących wykorzystania fragmentów ligandów dla receptorów z rodziny HER jako nośników dla efektorów małocząsteczkowych. W chwili obecnej przeciwciała, jako cząsteczki samodzielne lub w połączeniu ze związkami cytotoksycznymi, mimo pewnych wad, są grupą dominującą wśród opracowywanych cząsteczek biologicznych. Głównymi ograniczeniami związanymi z wykorzystaniem przeciwciał są: immunogenność, skłonność do agregacji i brak możliwości produkcji w prokariotycznych systemach ekspresji, takich jak powszechnie stosowany system *E.Coli*. Nośniki białkowe oparte o naturalnie występujące ligandy mogą być dobrą alternatywą. Ponadto, Wnioskodawca wykorzystuje do poszukiwania nowych sekwencji nośników białkowych technikę *Phage Display*. Daje to dużą szansę na wytypowanie

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

nieznanych, nowych nośników, które będą specyficznie łączyć się z wybranym celem molekularnym.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: wytypowanie cząsteczek do badań toksykologicznych i klinicznych. Całe przedsięwzięcie daje nadzieję na pracowanie bezpiecznej dla pacjentów terapii przeciwnowotworowej.

Realizacja projektu BIOCON, oprócz szansy na opracowanie cząsteczki o działaniu przeciwnowotworowym, to również **rozwińnięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy** z zakresu terapii celowanych, bezpieczeństwa leków i procesu biokoniugacji. Pozyskane dane stanowiące wartość intelektualną firmy Adamed zostaną wykorzystane w procedurze ochrony praw patentowych, przyczyniając się do zwiększenia potencjału gospodarczego firmy i kraju.

Wyniki realizowanych badań będą przedmiotem publikacji naukowych oraz wystąpień na konferencjach.

Uzyskana wiedza i doświadczenie zostaną wykorzystane w trakcie prowadzenia innych projektów w firmie Adamed, a także zostaną wdrożone w postaci zasad i procedur laboratoryjnych, drzew decyzyjnych czy strategii prowadzenia badań przedklinicznych.

Uwzględnienie zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R):

- W pracowni Zespołu ds. Zwierząt Laboratoryjnych Grupy Adamed badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych prowadzone są zgodnie z zasadami 3R, których wykorzystanie zapewnia uzyskiwanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników, co wyraża się za pośrednictwem poniższych działań:
 - Wykorzystywanie do badań zwierząt z certyfikowanych hodowli prowadzących restrykcyjne programy monitorowania stanu zdrowia i zgodności genetycznej stad hodowlanych (zasada doskonalenia),
 - Planowane procedury prowadzone są w sposób umożliwiający wykorzystanie możliwie jak najmniejszej liczby zwierząt poprzez: Prowadzenie badań w celu określenia parametrów farmakokinetycznych poszczególnych cząsteczek na grupach o małej liczebności (3 osobniki). Dzięki temu liczba zwierząt wykorzystanych w badaniach może zostać znacznie zmniejszona. (zasada ograniczania i doskonalenia),
 - Monitorowanie literatury, również w zakresie zapewniania dobrostanu i stosowania humanitarnych punktów końcowych, umożliwiające prowadzenie badań w sposób ograniczający stres i cierpienie zwierząt (zasada doskonalenia).
 - Selekcja związków pozwalająca na zmniejszanie w każdym kolejnym etapie badań liczby molekuł, których przetestowanie wymaga wykorzystania modeli zwierzęcych.

Liczba zwierząt użytych w badaniach jest ściśle związana z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vitro*. Wnioskodawca opracował panel eksperymentów, które mają na celu dopuszczenie do badań *in vivo* tylko najbardziej obiecujących cząsteczek (zasada ograniczania). W pierwszej kolejności prowadzone są badania *in silico* (modelowanie komputerowe) (weryfikacja idei), następnie testy wiązania opracowywanych cząsteczek (nośników, biokoniugatów) z celem molekularnym z wykorzystaniem najnowocześniejszej aparatury (Biacore oraz Octet), a na końcu testy cytotoksyczności na szerokim panelu linii komórkowych. Każdy eksperyment jest odpowiednio okontrolowany i powtarzany minimum trzykrotnie.

Przyjęte kryteria selekcji mają na celu ograniczenie liczby zwierząt wykorzystanych do testowania cząsteczek, które nie mają szansy powodzenia w rozwoju klinicznym.