

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Badanie celowanej modyfikacji epitopów na immunogenność i aktywność bakteriobójczego białka litycznego Cpl-1

2.Czas trwania projektu 20.07.2020 – 31.12.2022

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): enzymy lityczne, bakteriofagi, endolizyny, immunogenność, epitopy

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) A

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

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

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

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 projektu jest wyselekcjonowanie białek bakteriolitycznych stanowiących warianty enzymu bakteriobójczego Cpl-1 o obniżonej immunogenności in vivo, a tym samym określenie roli epitopów o potencjale immunogennym w indukcji przez to białko odpowiedzi humoralnej.

W obliczu występowania zakażeń wielolekoopornymi szczepami bakteryjnymi poszukuje się alternatywnych strategii terapeutycznych. Jedną z nich jest zastosowanie białek litycznych pochodzenia bakteriofagowego, m.in. endolizyn – enzymów degradujących ścianę komórkową bakterii, które cechuje wysoka efektywność i specyficzność oraz bardzo szybki czas działania. Takim białkiem jest m.in. enzym Cpl-1. Perspektywa zastosowania terapeutycznego białek pochodzenia fagowego jest obciążona ryzykiem niepowodzenia ze względu na szybką indukcję przeciwciał neutralizujących. Jest to typowy problem w wypadku leków biologicznych o

charakterze białkowym. We wcześniejszych badaniach wyselekcjonowano epitopy wybranych białek litycznych potencjalnie zaangażowane w indukcję przeciwciał specyficznych – a więc fragmenty o wysokim potencjale immunogennym. Analiza bioinformatyczna i mikrobiologiczna pozwoliła na zaprojektowanie zestawu nowych wariantów białka Cpl-1 o potencjalnie obniżonej immunogenności, przy zachowanej aktywności bakteriobójczej. Aktywność bakteriobójcza została oceniana *in vitro*, ale specyfika (złożoność) odpowiedzi ze strony układu immunologicznego nie pozwala na ocenę i porównanie ich faktycznej immunogenności poza organizmem zwierzęcia.

Szczegółowo, realizacja projektu dostarczy wiedzy, jakie warianty Cpl-1 mają najlepszy potencjał do terapii ludzi i zwierząt. Przede wszystkim, da to szansę na skuteczne zastąpienie antybiotyków przez ten enzym w infekcjach, które spowodują wrażliwe na Cpl-1 bakterie. W szerszej perspektywie, projekt dostarczy też oryginalnych danych, które na przykładzie Cpl-1 pozwolą na lepsze zrozumienie mechanizmów zaangażowanych w indukcję odpowiedzi odpornościowej przez białka bakteriofagowe o potencjale terapeutycznym. Zdobyta wiedza pozwoli na lepszy dobór endolizyn oraz ich ukierunkowane modyfikacje w przyszłości – a tym samym lepsze dopasowanie tych białek do wymagań przemysłu farmaceutycznego i indywidualnego stanu organizmu pacjenta (personal medicine).

Przewidywane szkody u zwierząt: może wystąpić stres i ból związany dootrzewnowym podaniem preparatów oraz z kilkukrotnym pobraniem krwi z żyły ogonowej w znieczuleniu miejscowym.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa C57Bl/6, liczba: 135

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Białka lityczne pochodzenia bakteriofagowego są obecnie rozważane jako ważna alternatywa dla antybiotyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt. Obecnie prowadzonych jest kilka testów klinicznych dotyczących medycznego zastosowania najlepiej poznanych dotąd endolizyn w terapii infekcji bakteryjnych. Bezpieczeństwo endolizyn zostało wstępnie potwierdzone, jednak nadal niewiele wiadomo na temat oddziaływań endolizyn z układem odpornościowym ssaków, szczególnie w kontekście ich modyfikacji w celu obniżenia immunogenności i poprawy biodostępności, farmakokinetyki i skuteczności terapeutycznej. Podjęty w tym

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

projekcie problem badawczy czyli obniżanie immunogenności endolizyn nie był dotąd badany w wypadku enzymu Cpl-1; w toku są jeszcze badania zaledwie jednej endolizyny: Pal, która okazuje się mieć zupełnie inną charakterystykę strukturalną i funkcjonalną i nie może Cpl-1 zastępować. Jego realizacja pozwoliłaby na ustalenie, czy celowane modyfikacje zapewnią poprawę właściwości Cpl-1 przy zachowaniu aktywności bakteriobójczej. Uzyskane dane pozwolą zatem na poszerzenie istniejącej wiedzy na temat oddziaływań białek litycznych pochodzenia bakteriofagowego z układem odpornościowym ssaków w zakresie, który dotąd nie został zbadany.

Zasada zastąpienia – postawiony problem badawczy wymaga przeprowadzenia badań na modelu ssaczym. Nie ma możliwości kompleksowej oceny i porównania immunogenności białek oraz kinetyki odpowiedzi humoralnej na liniach komórkowych/tkankowych czy na zwierzętach o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego. Projekt został zaplanowany w oparciu o dotychczasowe badania immunogenności białek pochodzenia bakteriofagowego, w tym białek enzymatycznych o aktywności litycznej przeprowadzone przez nasz zespół oraz dostępną literaturę.

Zasada ograniczenia – zestaw nowych wariantów aktywnych białek o potencjalnie obniżonej immunogenności zaprojektowano w oparciu o analizę bioinformatyczną – spośród tych białek do badań *in vivo* w modelu mysim wytypowane zostaną tylko warianty o najlepszej aktywności bakteriobójczej oznaczonej *in vitro*. W oparciu o dotychczasowe doświadczenia została określona minimalna liczba osobników w każdej grupie przy typowym rozkładzie wyników, która zapewni znamienność statystyczną. Dodatkowo odpowiednie dobranie metod statystycznych pozwoliło na zredukowanie liczby myszy wykorzystanych w doświadczeniach.

Zasada udoskonalenia – wszystkie czynności zostały tak zaplanowane, aby maksymalnie zniwelować ból i stres zwierząt. Podczas pobierania krwi z żyły ogonowej ogon zostanie miejscowo znieczulony lidokainą, aby zniwelować odczuwanie bólu.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.