

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Nanoenkapsulowane Światłoczułe Leki w Terapii Fotodynamicznej Opornych Nowotworów i Drobnoustrojów**”

2. Czas trwania projektu **48 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) terapia fotodynamiczna, oporność wielolekowa, leki światłoczułe, chemioterapia, immunoterapia

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.

Choroby nowotworowe stanowią jedno z najważniejszych wyzwań medycyny. Ograniczona skuteczność stosowanych schematów leczenia wynika przede wszystkim z tego, że oprócz cech tej choroby (heterogenność, inwazyjność), ogromnym problemem jest wzrost oporności wielolekowej, która może wynikać z uwarunkowań genetycznych i bezpośrednio wiązać się z prowadzonym leczeniem. Jedną z obiecujących strategii medycznych jest terapia fotodynamiczna (PDT), która umożliwia niszczenie komórek nowotworowych przy minimalnym uszkodzeniu tkanek zdrowych leżących w otoczeniu guza. Nasz zespół w ramach wieloletnich badań nad lekami do PDT, doprowadził jeden ze związków do II fazy badań klinicznych. Dotychczasowe doświadczenie i badania nad zrozumieniem mechanizmów odpowiedzialnych za efektywność PDT pozwoliło na zaprojektowanie biblioteki nowych leków, które chcemy poddać dalszym badaniom pod kątem ich skuteczności wobec nowotworów bardziej inwazyjnych, opornych na chemioterapię i klasyczną immunoterapię. W celu przezwyciężenia mechanizmów oporności projektując testowane leki dokonaliśmy ich funkcjonalizacji poprzez enkapsulację w nanomicelach polimerowych, które selektywnie akumulują się w tkance nowotworowej.

Przeprowadzone do tej pory badania *in vitro* wskazały bardzo silny efekt fotodynamiczny. Zatem by wprowadzić związek do etapu prób klinicznych koniecznym jest ustalenie dokładnego protokołu postępowania w trakcie terapii *in vivo*. W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie takiej ilości zwierząt, która pozwoli na rzetelną ocenę działania wybranych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Wyniki badań dostarczą wiedzy na temat zależności struktura-aktywność biologiczna oraz pozwolą zrozumieć mechanizmy lekooporności oraz zaproponować możliwości ich przezwyciężenia. W wyniku przeprowadzonych badań obejmujących podstawowe etapy procesu rozwoju leków, spośród biblioteki modyfikowanych związków chemicznych wyselekcjonujemy struktury najbardziej obiecujące, mogące w przyszłości znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek: *Mus musculus* BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6J

Wiek: 8-10 tygodni

Liczba: 200 BALB/c, 130 BALB/c nude, 250 C57BL6J

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PubMed/MEDLINE, Wiley Online Library, Scopus, Web of Science oraz Google Scholar. Przeszukano literaturę polską oraz zagraniczną z lat 2000-2018 pod kątem artykułów opisujących problematykę nowych metod terapii przeciwnowotworowej oraz terapii fotodynamicznej z uwzględnieniem problematyki oporności wielolekowej.

Wykorzystałem słowa kluczowe: „Photodynamic Therapy”, „photoimmunotherapy”, „multidrug resistance”, „chemotherapy”, „immunotherapy”, „immuneoncology”, „phototherapy”, „targeted anticancer therapy”

Na podstawie literatury stwierdzam, że: Pomimo postępu medycyny oraz rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych, aktualnie stosowane schematy leczenia oparte głównie o chemioterapię i radioterapię to metody inwazyjne, niespecyficzne oraz niestety nie zawsze skuteczne. Dodatkowo znacznym problemem klinicznym w przypadku leczenia systemowego opartego na lekach cytotoksycznych i antyproliferacyjnych jest ciągle obserwowany wzrost oporności wielolekowej (MDR). Obecny stan wiedzy na temat chorób nowotworowych pozwala wnioskować, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie innowacyjnej strategii działającej wielokierunkowo, poprzez zróżnicowane mechanizmy biologiczne ukierunkowane na zniszczenie nowotworu. Terapia fotodynamiczna (PDT) stanowi jedną z alternatywnych metod leczenia nowotworów, stosowaną komplementarnie w stosunku do tradycyjnych schematów terapeutycznych. Poprzez odpowiedni dobór fotosensybilizatora oraz stosowanie optymalnych protokołów terapeutycznych jej działanie jest wielokierunkowe, wynikające zarówno z bezpośredniej śmierci komórkowej na drodze apoptozy/nekrozy, niszczenia okołoguzowych naczyń nowotworowych oraz

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

generowania długoterminowej przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego. Dlatego też może okazać się skuteczna zwłaszcza wobec nowotworów o wysokim stopniu złośliwości, opornych na tradycyjnie stosowane schematy leczenia takie jak chemio- czy immunoterapia.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: Do skutecznej terapii fotodynamicznej nowotworów o zwiększonej oporności może przyczynić się: (i) Inteligentna modyfikacja struktury fotosensybilizatorów, i nanoformulacji, która pozwala zwiększyć ich selektywność i decyduje o ich aktywności biologicznej i możliwości zastosowania w PDT i/lub PDI. (ii) Skuteczność PDT z zastosowaniem opracowanych w projekcie leków zależy od fenotypu komórek nowotworowych - ich heterogenności, inwazyjności oraz poziomu naturalnej/nabytej oporności. (iii) Efektywność nowych leków wobec komórek opornych na tradycyjne schematy leczenia zależy od rodzaju generowanych reaktywnych form tlenu (tlen singletowy vs. rodniki hydroksylowe. (iv) Dlatego też planowane badania in vivo pozwolą określić zależność pomiędzy strukturą potencjalnych leków i ich aktywnością biologiczną (SAR) oraz wpływem zastosowanych modyfikacji na końcowy indeks terapeutyczny. Obserwowane w trakcie badań zmiany ekspresji białek oporności wielolekowej oraz czynników odpowiedzialnych za jej rozwój mogą odpowiadać za wzrost oporności komórek nowotworowych. W związku z tym, PDT z zastosowaniem proponowanych leków może stać się innowacyjną metodą leczenia nowotworów, pozwalającą na ograniczenie zjawiska oporności wielolekowej.

B. Brak jest danych dotyczących

Szczególnie mało informacji jest na temat zastosowania pochodnych bakteriochloryn w fotoimmunoterapii oraz schematach terapii kombinowanej obejmujących PDT w skojarzeniu z chemio- lub immunoterapią. Ponadto, mechanizmy molekularne z uwzględnieniem mechanizmów oporności komórek nowotworowych na PDT z zastosowaniem fotomateriałów absorbujących promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, enkapsulowanych w nanomicelach nie zostały dotychczas poznane i jednoznacznie wyjaśnione.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Uzyskane podczas realizacji projektu wyniki pozwolą tak zoptymalizować terapię, aby maksymalnie stymulować układ immunologiczny przeciwko komórkom nowotworowym, dzięki czemu możliwe będzie wyeliminowanie nie tylko guzów pierwotnych rosnących u myszy, ale również osiągnięcie odpowiedzi systemowej determinujących możliwość wyeliminowania przerzutów oraz subpopulacje komórek nowotworowych o zwiększonej oporności – przeżywające po zastosowaniu klasycznych metod leczenia. Projekt zakłada zarówno badanie mechanizmów śmierci komórkowej in vitro, jak również analizę odpowiedzi immunologicznej całego organizmu myszy. Dzięki tak kompleksowemu podejściu będzie możliwe określenie istotnych czynników chemicznych i biochemicznych determinujących skuteczność terapeutyczną oraz odpowiedź immunologiczną przy zastosowaniu pochodnych bakteriochloryn.

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:

Projekt generuje nową wiedzę z zakresu chemii medycznej, biologii molekularnej i farmakologii i wpływa na rozwój fotomedycyny. Znaczenie projektu sprowadza się do zaproponowania nowych narzędzi terapeutycznych do walki chorobami nowotworowymi oraz zakażeniami bakteryjnymi, które stanowią jedno z najważniejszych problemów zdrowia publicznego. Proponowane badania prowadzą do zrozumienia ograniczeń skuteczności tradycyjnych, powszechnie stosowanych metod terapeutycznych (chemioterapia, antybiotykoterapia) wynikających z oporności wielolekowej. Możliwa będzie wnikliwa

analiza oraz zrozumienie mechanizmów nabywania oporności, które ograniczają efektywność stosowanych procedur terapeutycznych.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:

Uzyskane wyniki pozwolą na zaproponowanie nowego podejścia do optymalizacji protokołów fototerapeutycznych, które znajdą swoje odzwierciedlenie w skuteczności testów *in vivo*. Badania przedkliniczne (*in vitro*, *in vivo*) pozwolą na wyselekcjonowanie najbardziej obiecujących leków, które będą mogły znaleźć zastosowanie kliniczne w terapii fotodynamicznej nowotworów oraz leczeniu infekcji bakteryjnych. Projekt stanowi, zatem odpowiedź na problemy o charakterze zdrowotnym i społecznym. Wyniki naszych badań nie tylko dostarczą wiedzy na temat zależności struktura-aktywność biologiczna (SAR) potencjalnych leków do terapii fotodynamicznej, ale również pozwolą zrozumieć mechanizmy leko- i antybiotykoodporności oraz zaproponować możliwości ich przezwyciężenia. W wyniku przeprowadzonych badań obejmujących podstawowe etapy procesu rozwoju leków, spośród biblioteki modyfikowanych związków chemicznych wyselekcjonujemy struktury najbardziej obiecujące, mogące w przyszłości znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Dodatkowo, **ważnym aspektem z punktu zasady 3R** w planowanym doświadczeniu jest fakt, iż:

i) wybrane modele nowotworów, do których należy m.in. model guzów A549 rosnących u myszy BALB/c nude, CT26, którym obarczone zostaną myszy BALB/c oraz model czerniaka B16 rosnący u myszy C57BL/6J jest od lat badany w naszej grupie badawczej i charakteryzuje się bardzo dobrą przyjmowalnością, znaną strukturą morfologiczną oraz kinetyką wzrostu. W ramach innych projektów badawczych wykonano wstępne eksperymenty (fotosensybilizatory z grupy chloryn oraz innych halogenowych pochodnych bakteriochloryn), co umożliwi rzetelne i wiarygodne porównanie uzyskanych wyników.

ii) Badane związki również należą do grupy syntetycznych bakteriochloryn i ftalocyjanin, a ich zaletami oprócz właściwości fizykochemicznych, braku agregacji i możliwości ich wzbudzania promieniowaniem z zakresu okna fototerapeutycznego (650-800 nm) jest odpowiednia funkcjonalizacja umożliwiająca korzystniejszą selektywność wobec guzów nowotworowych (na podstawie badań *in vitro*). Przeprowadzone do tej pory badania *in vitro* wskazały bardzo silny efekt fotodynamiczny. Zatem by wprowadzić związek do etapu prób klinicznych koniecznym jest ustalenie dokładnego protokołu postępowania w trakcie stosowanej terapii czy diagnostyki.

iii) W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie grup eksperymentalnych po 8 osobników każda, co pozwoli na rzetelną ocenę działania wybranych, nowych środków farmaceutycznych o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej (wykazanej na etapie dotychczas przeprowadzonych badań *in vitro*) na mysim modelu *in vivo*. W oparciu o doświadczenie naszego zespołu i publikacje naukowe związane z zastosowaniem fotosensybilizatorów tetrapirolowych w modelach *in vivo*, 8 osobników na grupę to liczba konieczna i wystarczająca do przeprowadzenia wiarygodnej statystyki.

iv) Materiał ze zwierząt wykorzystany zostanie do szeregu analiz, w tym barwienia immunohistochemicznego, barwienia immunofluorescencyjnego, analizy ekspresji genów oraz analizy poziomu białek. Wyizolowane tkanki będą udostępniane na terenie Użytkownika uwzględniając zasady zastąpienia w doświadczeniach.

v) Nasz zespół posiada doświadczenie w doświadczeniach opartych o wybrane modele nowotworów (CT26, A549, B16F10), przeprowadzaniu zabiegów inokulacji komórek nowotworowych, iniekcji

substancji terapeutycznych, prowadzenia terapii fotodynamicznej oraz pobierania materiału biologicznego do dalszych etapów eksperymentu. Nie spodziewamy się zatem strat wynikających z błędów w samej procedurze badawczej.

vi) Proponowana grupa wykorzystanych myszy z wybranych szczepów jest wystarczająca do uzyskania statystycznie istotnych wyników badań przeprowadzonych na co najmniej pięciu modelach nowotworów (zarówno mysich jak i ludzkich) o różnym stopniu inwazyjności oraz charakteryzujących je mechanizmami oporności na powszechnie stosowane schematy leczenia (lekooporność, heterogenność, zdolność do przerzutowania).

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.