

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Ocena wpływu planowej modyfikacji epitopów na immunogenność i aktywność bakteriobójczego białka litycznego Pal

2.Czas trwania projektu ~~02.01.2020 – 31.12.2022~~
15.01.2020-31.12.2022

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 Pal 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 Pal. 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 Pal 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 Pal mają najlepszy potencjał do terapii ludzi i zwierząt. W szerszej perspektywie, projekt dostarczy oryginalnych danych, które na przykładzie Pal 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: 288

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 projekcie problem badawczy czyli obniżanie immunogenności endolizyn nie był dotąd badany, ani w wypadku enzymu Pal, ani żadnej innej endolizyny. Jego realizacja pozwoliłaby na ustalenie, czy celowane modyfikacje

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

zapewnią poprawę właściwości Pal 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.