

Tytuł projektu

Pierwsza *first-in-class* innowacyjna cząsteczka DK-AT390HCl typu 'small-molecule' wykazująca działanie przeciwnowotworowe w modelu zwierzęcym raka jelita grubego

Zadania, działania, które będą realizowane w ramach projektu (opis, co zostanie zrobione, ew. zakupione)

Rak jelita grubego (colorectal cancer - CRC) to jeden z najczęściej diagnozowanych typów nowotworów, najczęściej niestety w terminalnej fazie. Powszechnie wiadomym jest, że cytostatyki używane podczas chemioterapii są związkami niszczącymi zarówno komórki nowotworowe jak i zdrowe, powodując wiele skutków ubocznych. Obiecującym celem molekularnym wydaje się pewien czynnik transkrypcyjny należący do rodziny „forkhead box” - jego nadekspresja związana jest z rozrostem guza, naciekaniem na struktury sąsiednie czy też przerzutowaniem lub lekoodpornością. Wstępne wyniki badań wskazały, że oryginalna cząsteczka DK-AT390HCl cechuje się wysoką cytotoksycznością w stosunku do linii komórkowych raka jelita grubego SW480 oraz SW620 pozostając obojętna dla zdrowych komórek linii CCD841, oraz zdolna jest do hamowania ekspresji wspomnianego czynnika transkrypcyjnego. Celem niniejszego projektu, są dalsze badania przedkliniczne pozwalające na poznanie właściwości oryginalnej cząsteczki DK-AT390HCl.

W projekcie zaplanowano pakiet badań związany z oceną aktywności kinazowej badanej cząsteczki. Badanie to będzie miało na celu określenie czy związek oddziałuje z kinazami, często stanowiącymi punkt uchwytu leków przeciwnowotworowych. Oddziaływanie na wiele kinaz może być związane z pojawieniem się potencjalnych efektów ubocznych, czego chcielibyśmy uniknąć. Kolejne zadanie to próba wykrycia kompleksu białko – DK-AT390HCl. Dzięki temu badaniu, w lepszy sposób można będzie poznać mechanizm działania na poziomie molekularnym. Kompleks ten, stanowić będzie cenne źródło informacji pomocne przy komputerowym projektowaniu nowych inhibitorów. Dalsze etapy projektu, to badania *in vivo* z udziałem modelu zwierzęcego. W pierwszej kolejności oceniona zostanie toksyczność oraz maksymalnie tolerowana dawka. Uzyskane dane będą ważne celem zbadania efektywności związku. W tym najważniejszym etapie badań, myszy zostaną dojelitowo zaszczepione komórkami nowotworowymi. Po uzyskaniu właściwego rozmiaru guza, badany związek (oraz kontrolnie placebo) i mieszanina DK-AT390HCl – 5-FU zostaną podane zwierzętom. W następnych kilku tygodniach oceniać będziemy czy zmiany zostały wywołane. Na tym etapie spodziewamy się statystycznego zmniejszenia objętości i masy guza. Po zakończeniu eksperymentu, pobrany zostanie materiał tkankowy a następnie oceniony na poziomie molekularnym i genetycznym w tym m.in. zmiany w ekspresji wspomnianego wcześniej czynnika transkrypcyjnego.



Grupy docelowe (do kogo skierowany jest projekt, kto z niego skorzysta)

Przykładowi odbiorcy projektu to firmy farmaceutyczne prowadzące prace badawczo-rozwojowe w kierunku terapii przeciwnowotworowych. Odbiorcami projektu mogą być również inne grupy badawcze, posiadające zasoby finansowe aby móc dalej badać związek, bądź też zmieniać cel terapeutyczny. Jedynie firmy farmaceutyczne lub ośrodki badawcze posiadające zasoby finansowe mogą odkupić związek aby dalej mógł przechodzić przez fazy R&D by w przyszłości stać się kandydatem na lek.

Cel lub cele projektu.

Niniejszy projekt to projekt interdyscyplinarny na pograniczu chemii medycznej oraz farmakologii/farmacji, dotyczący zbadania skuteczności przeciwnowotworowej wyselekcjonowanej cząsteczki DK-AT390HCl uzyskanej w poprzednich badaniach podstawowych. Celem projektu będzie poznanie właściwości biologicznych oraz efektywności przeciwnowotworowej z użyciem modelu zwierzęcego raka jelita grubego. Spodziewamy się uzyskania statystycznego zmniejszenia masy i objętości guza oraz udowodnienie, że związek DK-AT390HCl wykazuje efekt przeciwnowotworowy w organizmie żywym (proof-of-concept).

Efekty, rezultaty projektu (jeśli opis zadań, działań nie zawiera opisu efektów, rezultatów)

Realizacja projektu Proof of Concept pozwoliła na uzyskanie spójnych i jednoznacznych wyników, które potwierdziły zarówno zasadność postawionej hipotezy badawczej, jak i wysoki potencjał aplikacyjny badanego związku DK-AT390HCl. Celem projektu było sprawdzenie, czy cząsteczka ta wykazuje działanie przeciwnowotworowe w raku jelita grubego poprzez modulację aktywności czynnika transkrypcyjnego FOXM1, a uzyskane dane jednoznacznie potwierdziły to założenie. Na etapie badań *in vitro* wykazano, że DK-AT390HCl skutecznie hamuje proliferację komórek nowotworowych linii CT26 w sposób zależny od dawki, przy wyraźnie mniejszym wpływie na komórki prawidłowe. Testy funkcjonalne potwierdziły również ograniczenie zdolności komórek do migracji oraz tworzenia kolonii. Analizy molekularne wykazały obniżenie ekspresji FOXM1 oraz genów bezpośrednio związanych z regulacją cyklu komórkowego, takich jak CCNB1 i CDC25B, co wskazuje na cytostatyczny mechanizm działania badanego związku. Kluczowym rezultatem projektu było potwierdzenie skuteczności DK-AT390HCl w warunkach *in vivo*. W mysim modelu ortotopowym raka jelita grubego związek ten istotnie hamował wzrost guza, zmniejszał jego masę oraz prowadził do wydłużenia czasu przeżycia zwierząt. Efekt ten był wyraźnie silniejszy niż w przypadku standardowej chemioterapii 5-FU, a terapia skojarzona DK-AT390HCl z 5-FU wykazywała działanie synergistyczne. Co istotne, w grupach leczonych DK-AT390HCl nie obserwowano przerzutów do płuc ani wątroby, podczas gdy w grupie kontrolnej nowotworowej zmiany przerzutowe występowały często. Analiza materiału tkankowego potwierdziła molekularne podstawy obserwowanego efektu terapeutycznego. W badaniach Western blot oraz immunohistochemii wykazano obniżenie poziomu białka FOXM1 i jego aktywnej, fosforylowanej formy w tkankach jelita, wątroby i płuc. Towarzyszyła

temu częściowa normalizacja architektury badanych narządów oraz redukcja zmian nowotworowych i zapalnych, szczególnie widoczna w grupie terapii skojarzonej. Wyniki te wskazują, że DK-AT390HCl oddziałuje na FOXM1 głównie na poziomie potranslacyjnym, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia trwałości efektu terapeutycznego. Istotnym elementem projektu była również ocena bezpieczeństwa i selektywności związku. Badania maksymalnej tolerowanej dawki wykazały dobrą tolerancję DK-AT390HCl w modelu zwierzęcym. Profilowanie kinazowe potwierdziło bardzo wysoką selektywność cząsteczki, przy jednocześnie silnym powinowactwie do kinazy lipidowej PIKfyve, co dodatkowo wzmacnia jej potencjał rozwojowy i ogranicza ryzyko działań niepożądanych. Choć nie udało się uzyskać struktury krystalicznej kompleksu FOXM1 z DK-AT390HCl, przeprowadzone prace doprowadziły do opracowania wydajnego systemu ekspresji i oczyszczania domeny FOXM1-DBD oraz do uzyskania wysokiej jakości kryształów kompleksu FOXM1–DNA. Stanowi to wartościowy rezultat metodyczny i solidną podstawę do dalszych badań strukturalnych w kolejnych etapach rozwoju projektu.

Wartość projektu, (łącznie koszt)

591 752,91 zł

Wysokość wkładu Funduszy Europejskich.

591 752,91 zł