



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0070

Predklinická validácia inovatívnej antisense platformy pre CML

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Filip Rázga, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Lekárska fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Lekárska Fakulta UK v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Ústav Hematologie a Krevní Transfúze v Prahe (nefinancovaný)

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo užitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

-

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Publikácie:

- Svítkova B, et al. Plate reader spectroscopy as an alternative to atomic absorption spectroscopy for the assessment of nanoparticle cellular uptake. Heliyon, 2022; 8: e11595
- Nemethova V, Razga F. ESINAR-X, Precise action in the treatment of leukaemia. Research Features 2023; 145: 26-29
- Nemethova V, et al. ASP210: a potent oligonucleotide-based inhibitor effective against TKI-resistant CML cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2024; 327(1): C184-C192

Konferencie:

- Domsicova M, et al. 2021, DNA-Aptamers: a sensitive tool for detection of oncological diseases by quartz crystal microbalance, 3rd European Biosensor Symposium, Marec 09-12
- Nemethova V, et al. 2021, Selective RNA inhibitor-induced apoptosis of TKI-resistant CML cells, 17th Annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, September 26-29
- Selc M, et al. 2022, Periostin – novel biomarker and therapeutic target in CKD? Genetická toxikológia a prevencia rakoviny, May 2-5
- Nemethova V, et al. 2022, ASP210 – a potent oligonucleotide-based inhibitor for combating both BCR-ABL1 dependent and independent TKI-resistant CML cells. 64th ASH Annual Meeting and Exposition, December 10-13

- Nemethova V, et al. 2022, ASP210 effectively reduces the leukemic burden in JAXTM mice up to 99.1% within 10 days. 18th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, October 2-5
- Nemethova V, et al. 2022, ASP210 – a potent oligonucleotide-based inhibitor against TKI-resistant CML cells. 18th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, October 2-5
- Nemethova V, et al. 2022, Effective elimination of TKI-resistant CML cells using a tailor-made oligonucleotide-based inhibitor. 20th Annual Discovery on Target October 17-20
- Nemethova V, et al. 2022, Reduction of leukemic burden in mice by up to 99% within 10 days using a new generation oligonucleotide-based inhibitor. 20th Annual Discovery on Target, October 17-20
- Razga F, et al. 2023, ASP210 – terapeutický oligonukleotid pre liečbu CML. Aktuality v hematológii, Bratislava, Február 3-4
- Razga F, et al. 2023, ASP210 – špecifický inhibitor BCR-ABL1 mRNA pre liečbu CML. 35. Olomoucké hematologické dni, Olomouc, Máj 24-26
- Svitkova B, et al. Plate reader spectroscopy as a possible substituent for atomic absorption spectroscopy in the quantification of the cellular uptake of the nanoparticles. Genetic Toxicology and Cancer Prevention, Smolenice, Jún 12-15
- Teglasova B, et al. 2023, Novel oligonucleotide based therapy for effective reduction of TKI-resistant CML cells. Genetic Toxicology and Cancer Prevention, Smolenice, Jún 12-15
- Uhelska L, et al. 2023, An original therapeutic oligonucleotide effectively reducing the leukemic burden in a humanized mouse model of CML. Genetic Toxicology and Cancer Prevention, Smolenice, Jún 12-15
- Nemethova V, et al. 2023, An unconventional therapeutic oligonucleotide effective against TKI-resistant CML cells. TIDES Europe, Amsterdam, October 30-November 1
- Nemethova V, et al. 2023, Therapeutic oligonucleotide ASP210 effectively reduces the leukemic burden in humanized mice models of CML. TIDEEurope, Amsterdam, October 30-November 1
- Nemethova V, et al. 2023, An unconventional therapeutic oligonucleotide effective against TKI-resistant leukemia cells. Cancer Research Summit, November 14
- Nemethova V, et al. 2023, Therapeutic ASO ASP210 effectively reduces the leukemic burden in humanized mice models of CML. Cancer Research Summit, November 14
- Nemethova V, et al. 2024, An unconventional therapeutic oligonucleotide effectively eliminates TKI-resistant CML cells. 10th World Congress on Cancer Research and Therapy, June 20-22,
- Razga F, et al. 2024, Therapeutic oligonucleotide ASP210 effectively reduces the leukemic burden in humanized mice models of CML. 10th World Congress on Cancer Research and Therapy, June 20-22

Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt PRO4CML priniesol jedinečnú a dodnes nepublikovanú sadu vedeckých dát týkajúcich sa bezpečnosti a funkčnosti liečiva ASP210. ASP210 - terapeutický oligonukleotid charakteristický originálnym štruktúrnym dizajnom bol úspešne validovaný in vivo a ukázal potenciál pre transláciu do klinického hodnotenia. Získané dáta bezpečnosti ukázali, že ani jednorazové (24h, dávka 30 mg/kg) ani opakované (10 dní, 1 mg/kg/deň) intravenózne podávanie ASP210 nespôsobuje žiadne prejavy intoxikácie v zmysle behaviorálnych, senzorických, cytologických, histopatologických či patologických anomálií.

Rozsiahla funkčná validácia preukázala vysokú účinnosť ASP210 v zmysle jeho schopnosti potlačiť expresiu cieľovej mRNA v infiltrovaných orgánoch až o 99%, či jeho schopnosti redukovať cieľovú leukemickú masu až do jej kompletnej eradikácie.

Oba tieto aspekty tak jednoznačne kvalifikujú a legitimizujú toto originálne liečivo k ďalšiemu posunu na stupnici technologickej pripravenosti - ku klinickým skúškam na ľuďoch.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Prvým principiálnym výsledkom bola potvrdená schopnosť ASP210 terapeuticky pôsobiť v primitívnych (nezrelých) krvných elementoch. Tento, z aplikačného pohľadu kľúčový proof-of-principle experiment, bol realizovaný na ex vivo vzorkách de novo diagnostikovaných

CML pacientov využitím CFU-assay. ASP210 spôsobil redukciu počtu vzniknutých kolónií o 64 až 100%, čo dáva predpoklad terapeuticky pôsobiť v "zdrojových" bunkách ochorenia – leukemických kmeňových bunkách.

Druhým principiálnym výsledkom bola potvrdená jeho bezpečnosť in vivo. V zmysle hodnotenia potenciálnej toxicity ASP210, bol tento najprv testovaný pre posúdenie akútnej toxicity (24 h, jednorazová dávka 30 mg/kg) a subakútnej toxicity (10 dní, opakovaná dávka 1 mg/kg/deň) pri i.v. administrácii liečiva. Výsledky toxikologickej štúdie ukázali, že ani pri jednorazovej vysokej dávke 30-násobne prevyšujúcej terapeuticky účinnú dávku, či opakovanom dávkovaní ASP210 nedochádza k žiadnym pozorovaným prejavom intoxikácie ani anomáliám nielen z makroskopického, behaviorálneho či senzorického pohľadu, ale ani z pohľadu cytologického, patologického či histopatologického.

Tretím, najdôležitejším výsledkom riešenia projektu PRO4CML bolo potvrdenie terapeutической účinnosti ASP210 in vivo. Testovala sa účinnosť ASP210 použitím humanizovaného modelu CML myši (JAX) liečebným protokolom i.v. podania ASP210 v režime 1mg/kg/deň po dobu 10 dní. Výsledky potvrdili schopnosť ASP210 potlačiť expresiu BCR-ABL1 mRNA až o 99% v horizonte 10 dní. Histopatologická analýza potvrdila úbytok leukemickej masy vo vybraných orgánoch až o 50%. IVIS-CT potvrdila celotelovú distribúciu ASP210, čo naznačuje vynikajúcu biologickú dostupnosť liečiva po i.v. administrácii. Dáta boli získané 1h po podaní, čo vypovedá o pomerne rýchlej distribúcii ASP210 do cieľových orgánov. Účinnosť ASP210 bola preskúmaná aj v modeli C57BL/6 myší, kde s ohľadom na limitovaný rozvoj ochorenia sa sledoval efekt liečiva iba na leukemickú nálož v kostnej dreni. Funkčná štúdia v tomto modeli rovnako potvrdila terapeutický potenciál ASP210, nakoľko histopatologická analýza po zaliečení ukázala eradikáciu leukemickej masy a normálny nálež kostnej drene.

Štvrtým, pre klinickú prax obzvlášť sľubným výsledkom bolo potvrdenie terapeutической účinnosti ASP210 aj v CML bunkách rezistentných na v praxi aktuálne používané liečivá.

Implikácie dosiahnutých výsledkov pre klinickú prax sú samovypovedajúce, nakoľko poskytujú dôkazy nielen o bezpečnosti a funkčnosti ASP210 in vivo, ale aj o jeho progresívnosti, nakoľko dokáže úspešne eradikovať i TKI-rezistentné CML bunky, voči ktorým nateraz absentuje šetrné klinické riešenie.

Projektový zámer PRO4CML tak bol naplnený v plnej miere a úspešná predklinická validácia ASP210 in vivo kvalifikuje tento terapeutický oligonukleotid pre vstup do klinických fáz skúšania.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The first principal result was the confirmed ability of ASP210 to therapeutically act on primitive (immature) blood elements. This proof-of-principle experiment, which is crucial from an application perspective, was conducted on ex vivo samples from newly diagnosed CML patients using the CFU-assay. ASP210 caused a reduction in the number of resulting colonies by 64 to 100%, which suggests its potential therapeutic effect on leukemic stem cells.

The second principal result was the confirmation of its safety in vivo. Regarding the evaluation of the potential toxicity of ASP210, it was first tested to assess acute toxicity (24 h, single dose of 30 mg/kg) and subacute toxicity (10 days, repeated dose of 1 mg/kg/day) with intravenous administration of the drug. The results of the toxicological study showed that even with a single high dose 30 times higher than the therapeutically effective concentration, or with repeated dosing, there were no observed signs of intoxication or anomalies from a macroscopic, behavioral, sensory, cytological, pathological, or histopathological perspective.

The third and most important result of the PRO4CML project was the confirmation of the therapeutic efficacy of ASP210 in vivo. The efficacy of ASP210 was tested using a humanized CML mouse model (JAX) with a treatment protocol of intravenous administration of ASP210 at a dose of 1 mg/kg/day for 10 days. The results confirmed the ability of

ASP210 to suppress BCR-ABL1 mRNA expression by up to 99% within 10 days. Histopathological analysis confirmed a reduction of leukemic mass in selected organs by up to 50%. IVIS-CT confirmed whole-body distribution of ASP210, indicating excellent bioavailability of the drug after intravenous administration. Data were obtained 1 hour after administration, suggesting relatively rapid distribution of ASP210 to target organs. The efficacy of ASP210 was also explored in the C57BL/6 mouse model, where due to the limited development of the disease, the effect of the drug was assessed only in the bone marrow. Functional studies in this model also confirmed the therapeutic potential of ASP210, as histopathological analysis after treatment showed eradication of the leukemic mass and normal findings in the bone marrow. The fourth particularly promising result for clinical practice was the confirmation of the therapeutic efficacy of ASP210 in CML cells resistant to currently used drugs. The implications of the achieved results for clinical practice are obvious, as they provide evidence not only of the safety and functionality of ASP210 in vivo but also of its progressiveness, as it can successfully eradicate even TKI-resistant CML cells, for which there is currently no safe clinical solution. Thus, the PRO4CML project was fully implemented, and the successful preclinical validation of ASP210 in vivo qualifies this therapeutic oligonucleotide for entry into clinical trial phases.