

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Experimentální terapie lymfomu z pláštěvých buněk zaměřená na eradikaci minimální reziduální choroby na myších modelech

Doba trvání projektu pokusů 2 roky (do 30.6.2021)

Klíčová slova - maximálně 5 Lymfom z pláštěvých buněk (mantle cell lymfom, MCL), minimální reziduální choroby (MRD), patient-derived xenograft (PDX)

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

	základní výzkum
x	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Myší modely založené na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk do imunodeficientních myší (tzv. patient-derived xenografts, PDX) se v posledních několika letech staly standardem testování či ověřování preklinických experimentálních léčebných postupů v hematologii. PDX modely mají řadu nesporných výhod oproti buněčným liniím, neboť umožňují testování účinnosti experimentální látky na růst a šíření lymfomu a *in vivo* testování zahrnuje řadu klíčových parametrů (vztahy s mikroprostředím, hypoxie, metabolické změny, farmakokinetika), které v *in vitro* systémech testovat vůbec nelze. Maligní lymfomy představují nejčastější typ hematologických malignit v České republice. Lymfom z pláštěvých buněk představuje třetí nejčastější typ maligních lymfomů. U většiny pacientů se nedaří lymfom z pláštěvých buněk vyléčit za použití standardních léčebných postupů, což vyžaduje testování nových protilymfomových látek a léčebných strategií. Častým podkladem návratu (relapsu) lymfomu je přítomnost zbytkové choroby (minimální reziduální choroby), kterou lze detekovat pouze pomocí speciálních technik molekulární biologie (např. PCR), ale nikoli standardními zobrazovacími prostředky (CT, PET-CT). V předkládaném projektu hodláme testovat experimentální léčebné strategie zaměřené na eradikaci minimální reziduální choroby s cílem zabránit návratu (relapsu) lymfomu. Pokusy budou provedeny na vybraných myších PDX modelech lymfomu z pláštěvých buněk (mantle cell lymfomu), které představují unikátní modely vhodné pro testování eradikace minimální reziduální choroby. Experiment bude sestávat ze dvou částí. V první části (A) bude provedena podkožní xenotransplantace příslušných PDX buněk a po dosažení určité velikosti tumoru (1 cm) bude aplikována jednorázová terapie polymerního cytarabinu (4 mg / kg) s cílem lymfom eliminovat. Tato fáze odpovídá tzv. indukční části léčby (u pacientů). Z předchozích experimentů víme, že navzdory zdánlivému vymizení se lymfom u všech pokusných zvířat s latencí 4-8 týdnů po jednorázové aplikaci polymerního cytarabinu vrací, dochází tedy k relapsu choroby. Období od zdánlivého vymizení tumoru do jeho zjevného návratu představuje optimální model pro testování léčebných strategií zaměřených na eradikaci minimální zbytkové choroby. Tři týdny po aplikaci polymerního cytarabinu bude proto zahájena druhá fáze experimentu (B), kdy budou provedeny pokusy o eradikaci zbytkového lymfomu s cílem zabránit návratu lymfomu. Mezi testované postupy budou patřit následující postupy: B1. intravenózní aplikace T-lymfocytů s modifikovaným antigenním receptorem (tzv. chimeric antigen receptor (CAR) T lymfocyty) v dávce 10 milionů buněk / myš. CAR-19 T lymfocyty by měly cíleně vyhledat CD19+ lidské maligní lymfocyty a tyto eradikovat (bez poškození myších tkání). B2. intravenózní aplikace cíleného léčiva polatuzumab-vedotin (konjugát protilátky anti-CD79b a mitotického toxinu monomethyl-auristatinu E) v dávce 2 mg / kg. Podobně jako CAR T-lymfocyty také polatuzumab-vedotin cílenou vazbou na lymfomové buňky povede ke specifické eradikaci lidských lymfomových buněk bez toxicity vůči myším orgánům. B3. intraperitoneální aplikace polymerního cytarabinu konjugovaného s CD20 protilátkou s cílem cíleného dopravení cytarabinu k lymfomovým buňkám. B4. léčba venetoclaxem- inhibitory BCL2 anti-apoptického proteinu- v dávce 50mg/kg perorálně sondou denně po dobu 10 dnů. Venetoclax je proapoptická látka schopná eradikovat i nedělicí se buňky. B5. opětovná aplikace polymerního cytarabinu jako kontrolní rameno, vůči kterému budou experimentální ramena (B1-B4) porovnávána. Předpokládáme, že samotný cytarabin nebude vůči zbytkové chorobě účinný, neboť klasická genotoxická cytostatika účinkují optimálně vůči rychle se dělicím buňkám. V případě reziduální choroby předpokládáme přežití zejména dormantních, nedělicích se buněk, které je nutné eradikovat jiným způsobem (viz B1-B4). Skupina B6 bude léčena monoklonální protilátkou rituximab, která představuje v současné době standard v udržovací léčbě pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk. Také vůči této skupině budou experimentální postupy (B1-B4) srovnávány. Konečně skupina B7 zůstane bez léčby a bude tak odpovídat pacientům bez udržovací léčby.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

Preklinické zdůvodnění pro design klinické studie fáze 2 zacílené na eradikaci minimální zbytkové choroby u pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Tento typ studie není možné realizovat jinak než s použitím laboratorních zvířat – v současné době není k dispozici žádný alternativní systém či model, kterým by bylo možné laboratorní zvíře nahradit. Imunodeficientní NSG (*NOD-SCID-gamma*) a NOD-RAG myši jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity,

což umožňuje přijetí (xenotransplantaci) nádorových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 400 myší (dospělých samic).
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?
Podkožní aplikace lymfomových buněk je spojena s růstem lymfomu v podobě podkožního tumoru. Vzhledem k tomu, že experiment bude ukončen v okamžiku, kdy maximální rozměr tumoru dosáhne 2cm, není růst takto malého tumoru v podkoží spojen s bolestí, dyskomfortem či hubnutím experimentálních zvířat. Aplikace všech léčiv v plánovaných dávkách je pro pokusná zvířata netoxická. Plánované odběry krve z orbitálního plexu pro účely analýzy minimální reziduální choroby budou prováděna po uvedení pokusných zvířat do krátkodobé celkové anestezie ventilací směsí vzduchu a izofluranu. Navrhovaná míra závažnosti je tudíž 2 (střední).
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.
Pro plánované experimenty byl vybrán model imunodeficientní laboratorní myši, která umožňuje přijetí, růst a následnou léčbu lidských lymfomových buněk. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické <i>in vivo</i> testování (ověření) účinnosti a/nebo biodistribuce nových protinádorových léčiv před tím, než budou testována v rámci klinických studií na pacientech. Většinu protinádorových látek lze pouze omezeně testovat <i>in vitro</i> , jejich plnou protinádorovou účinnost lze preklinicky testovat pouze <i>in vivo</i> na zvířecích modelech, nejčastěji na myších modelech. Tuto skutečnost jsme ověřili také v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)).
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů hematologických malignit (30 různých PDX modelů odvozených reprezentujících hlavní typy agresivních lymfomů). Navrhované kombinace nebyly dosud testovány na myších PDX modelech agresivních lymfomů. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v lednu 2019. Statistická kalkulace pomocí χ^2 (chi-kvadrát) testu predikuje, že při použití 10 zvířat na skupinu bude dosaženo signifikance $p < 0.01$ při dosažení rozdílu o $> 60\%$ ve vypočítaných objemech tumorů mezi léčenou a neléčenou skupinou. Použití panelu 30 PDX modelů lidských agresivních lymfomů zajistí dostatečnou relevanci ve vztahu k molekulárně-cytogenetické heterogenitě maligních lymfomů, což je nezbytné pro zajištění relevance výsledků plánovaných pokusů. Tumory a vybrané orgány z pokusných myší budou zamrazeny za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.
Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.
Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.
Zdravotní stav zvířat a jejich reakce na podané léčivo bude sledována v průběhu experimentu od okamžiku aplikace až do ukončení experimentu. V případě pozorování negativních změn u laboratorního zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno. Experimentální léčba na myších modelech založených na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk (tzv. patient-derived xenografts) představuje uznávanou preklinickou alternativu k léčbě pacientů s daným typem nádorového onemocnění. Podkožní modely lymfomů jsou (ve srovnání se systémovými modely diseminovaných lymfomů založenými na intravenózní xenotransplantaci lymfomových buněk) pro myši šetrnější, neboť nevedou k hubnutí, alternaci celkového stavu či pre-terminální paralýze.