

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Experimentální imunoterapie pomocí anti-CD19 protilátky tafasitamab a imunomodulační látky lenalidomid na humanizovaných myších modelech difuzního velkobuněčného B-lymfomu	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	36 měsíců
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Humanized mice, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), patient-derived xenograft (PDX), tafasitamab, lenalidomide
Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností	
☐	základní výzkum
☒	translační a aplikovaný výzkum
☐	kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
☐	legislativní účely
☐	a běžná výroba
☐	zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie
☐	běžná výroba
☐	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
☐	zachování druhů
☐	vyšší vzdělávání
☐	odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
☐	trestní řízení a jiné soudní řízení
☐	udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech
Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb	
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. Imunodeficientní myši nicméně postrádají buněčné komponenty adaptivního imunitního systému, tj. lymfocyty (T- i B-lymfocyty, NK buňky). To prakticky znemožňuje využití myších modelů založených na xenotransplantaci lymfomových buněk do imunodeficientních myší pro testování experimentálních imunoterapeutických postupů včetně glykosylovaných monoklonálních protilátek (tafasitamab) či imunomodulačních látek (lenalidomid), jejichž protinádorový mechanismus spočívá v aktivaci NK buněk. Podobně na imunodeficientních myších modelech nelze testovat imunomodulační protilátky (tzv. check-point inhibitory) či bispecifické protilátky závislé na přítomnosti funkčních T-lymfocytů. Maligní lymfomy představují nejčastější typ hematologických malignit v České republice. Difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) představuje nejčastější typ maligních lymfomů na západní polokouli. U poloviny pacientů se nedaří DLBCL vyléčit za použití standardních léčebných postupů, což vyžaduje testování nových protilymfomových látek a léčebných strategií. Bylo opakovaně prokázáno, že imunoterapeutické léčebné postupy jsou schopné eradikovat i nádorové buňky rezistentní na chemoterapii. Různé imunoterapeutické postupy se testují také v léčbě difuzního velkobuněčného B-lymfomu a představují jedinou šanci na vyléčení v případě chemorezistentních forem onemocnění. V předkládaném projektu hodláme 1. odvodit humanizované myší modely lidského DLBCL a 2. testovat experimentální léčebné strategie založené na anti-CD19 protilátce tafasitamab, jejíž protinádorový účinek je zprostředkován hlavně aktivací NK buněk. Humanizovaný myší model vytvoříme xenotransplantací kmenových buněk z pupečnickové krve (získané z banky pupečnickové krve z Ústavu hematologie a krevní transfuze) do imunodeficientních myší. Humanizované myši budeme následně xenotransplantaovat lidskými lymfomovými buňkami. Na vybraných humanizovaných myších modelech DLBCL hodláme testovat protilymfomový účinek tafasitamabu v monoterapii či v kombinaci s imunomodulační látkou lenalidomid, která zvyšuje protinádorovou aktivitu NK buněk.	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)	
Preklinické zdůvodnění pro design klinických studií s tafasitamabem a lenalidomidem u pacientů s DLBCL.	

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - <i>uvedte počet těchto postupů a dobu jejich trvání</i>					
Jednorázová intravenózní aplikace kmenových buněk, jednorázová podkožní aplikace lymfomových buněk. Léčba myši s etablovanými lymfomy: 2 týdny. Léčebné postupy: tafasitamab a lenalidomid. Odběr krve (100uL) z orbitálního plexu 10 a 15 týdnů po xenotransplantaci kmenových buněk.					
Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků					
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 2 cm, není růst takto malého tumoru v podkoží spojen s bolestí, diskomfortem či hubnutím experimentálních zvířat. Aplikace všech léčiv v plánovaných dávkách je pro pokusná zvířata netoxická.					
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu					
Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	200			200	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu					0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu					0
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - <i>uvedte</i>					
Všechna zvířata budou na konci experimentu utracena.					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - <i>uvedte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>					
Pro plánované experimenty byl vybrán kmen imunodeficientních myši, který umožňuje připojení, růst lidských krvetvorných buněk a cílenou expanzi lidských NK buněk (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(IL15)1Sz/SzJ). Tento kmen zároveň umožňuje následnou xenotransplantaci lymfomových buněk a léčbu myši nesoucích lidský lymfom pomocí experimentálních imunoterapeutických postupů. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické <i>in vivo</i> testování (ověření) účinnosti nových imunoterapeutických postupů před tím, než budou testována v rámci klinických studií na pacientech. Většinu imunoterapeutických léčiv 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 - <i>vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).</i>					
Experimentální imunoterapeutické postupy budou validovány na 3 různých PDX modelech humanizovaných myši. Navrhované kombinace nebyly dosud u difuzního velkobuněčného lymfomu testovány. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v srpnu 2020. 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. Tumory a vybrané orgány z pokusných myši budou zamrazeny za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.					
Setrné zacházení se zvířaty - <i>uvedte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu</i>					
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. Xenotransplantace lidských krvetvorných buněk je pro imunodeficientní myši netoxická. 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.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

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-IL15 myši (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(IL15)1Sz/SzJ) jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity, což umožňuje přijetí (xenotransplantaci) jak lidských krvetvorných kmenových buněk, tak následně lymfomových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 200 myší (dospělých samic).

¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „**nespecifikovaného savce**“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech