

## NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

### Název projektu pokusů

Studium bioakumulace katalytických systémů feritin-enzym a hodnocení efektivity aktivace proléčiv v modelu laboratorní myši (*Mus musculus*), AZV NU21J-08-00043

|                                        |                   |
|----------------------------------------|-------------------|
| Doba trvání projektu pokusů v měsících | 24                |
| Klíčová slova                          | Feritin           |
| Proléčivo                              | Enzymová aktivace |
| Nanomedicína                           | 0                 |

### Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

0

0

0

### Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je rozšířit poznatky o možnostech tzv. bioorthogonální terapie založené na využití in situ aktivace netoxických proléčiv pomocí inteligentních katalyticky aktivních modalit. Takové nástroje jsou unikátní svou efektivitou a mohou být využity nejen v terapii nádorových onemocnění, ale také závažných infekcí či pro diagnostické zobrazování. V rámci projektu bude studována nová skupina katalyzátorů založených na protein-protein komplexech feritin-enzym, u kterých lze předpokládat vysokou stabilitu a biokompatibilitu. Na základě získaných dat tak mohou být navrženy nové terapeutické a diagnostické modalitty nejen pro nádorová onemocnění. Dílčím cílem projektu je pak studium bioakumulace nových katalyzátorů a determinace jejich tkáňové specifity, což bude zásadní pro další modifikace povrchu feritinu pro zajištění aktivních cílcích vlastností. Veškerá metodika pro experimenty na myši bude vycházet z rozsáhlých naplánovaných in vitro experimentů. Jako modelové zvíře bude použita inbrední laboratorní myš (*Mus musculus*) – obě pohlaví, a to ve stáří od 8 do 16 týdnů. Experimenty budou prováděny zejména na samcích a to z důvodu vyšší variability u samic při testování účinnosti léků. Účinnost navrhovaných rekombinantních feritinových proteinových klecí s enkapsulovanými enzymy budou ověřeny na samicích.

### Potenciální přínosy projektu pokusů

Primárním přínosem plánovaných experimentů bude především evaluace katalytické aktivity a následné protinádorové účinnosti komplexů feritin-enzym/proléčivo v organismu, což nelze vyhodnotit v tkáňových kulturách. Důležitým přínosem bude i popis biodistribuce a bioakumulace rekombinantních feritinů s enkapsulovanými enzymy in vivo. Tyto výsledky mohou odhalit nové směry využití testovaných proteinových katalyzátorů.

Výsledky získané těmito experimenty následně uveřejníme v recenzovaných časopisech a připravíme nové technologické postupy, které předpokládáme chránit formou užitého vzoru, případně patentu.

### Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Využijeme standardizované nádorové modely: karcinom mléčné žlázy (myší buňky 4T1), kolorektální karcinom CT26 (kmen BALB/c), lidský karcinom prsu MDA-MB-231, MDA-MB-468 a T47D (pro práci s kmenem nu/nu), přičemž pro všechny buněčné typy již známe expresi cílových receptorů feritinového nosiče (TfR1, SCARA5). Všechny nádory včetně modelu 4T1, budou indukovány jednorázovým subkutánním (s.c.) injikováním 105 – 106 nádorových buněk ve 100  $\mu$ L bezsérového média z kultury v den 0, a to na pravý nebo levý bok myši. Základem léčby budou rekombinantní feritinové proteinové klece s enkapsulovanými enzymy (thimidin kinasa, cytochrom P450, cytosine deaminasa) a separátně aplikovaná netoxická proléčiva (fluorocytosine, acyclovir, ifosfamide), která budou po kontaktu s feritinovými klecemi s enkapsulovanými enzymy konvertována in situ v cytotoxické látky. Feritiny budou dávkovány na základě již získaných zkušeností a budou podávány intravenózně (i.v.) po vyvinutí nádoru (většinou 6.-12. den v závislosti na použitém nádorovém modelu, kdy průměr nádorového ložiska odpovídá velikosti cca 8 mm). Feritiny budou myším dávkovány buď v jedné dávce (bolusově) nebo v několika dávkách, nejčastěji ve dvou dávkách každý třetí den. Po ukončení dávkování feritinů budou aplikována výše zmíněná proléčiva (předpokládáme jednu až dvě dávky v závislosti na

### Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Mírou utrpení je projekt charakterizován jako střední, kdy lze předpokládat, že zvířata mohou pocítit déletrvající bolest či diskomfort vlivem indukce nádorů. Zvířata také mohou pociťovat diskomfort vlivem aplikované léčby a možnou ztrátu hmotnosti, a to maximálně po dobu zahájení aplikace terapeutických modalit po terminaci experimentu. Systémová toxicita (pokud by nastala) bude kontrolována pravidelným sledováním tělesné váhy a celkového welfare myši v pokusu na základě behaviorálních (apatie, stereotypní chování, projevy sociálního chování) a fyziologických (snížení příjmu potravy, dehydratace, tělesná kondice, průjem) ukazatelů. Zvířata, u kterých dojde k poklesu hmotnosti o 15 či více procent, nebo velikost nádorů přesáhne 5 cm<sup>2</sup> budou z experimentu vyřazena a utracena.

### Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

| Druh zvířat                                  | Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti |       |         |         |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------|---------|---------|
|                                              | Nenabude vědomí                          | Mírná | Střední | Závažná |
| myš laboratorní ( <i>Mus musculus</i> ) [A1] | 2                                        | 0     | 1       | 0       |

|   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi**

| Druh zvířat | Odhadovaný počet zvířat |                                              |                    |
|-------------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|
|             | Opětovné použití        | Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště | Do zájmového chovu |
| 0           | 0                       | 0                                            | 0                  |
| 0           | 0                       | 0                                            | 0                  |
| 0           | 0                       | 0                                            | 0                  |
| 0           | 0                       | 0                                            | 0                  |

**Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty**

S ohledem na povahu plánované práce (indukce nádorů) je nutné a nejhumánnější zvířata po ukončení experimentů usmrtit. Pro tento účel bude eutanázie provedena předávkováním anestetikem či cervikální dislokací. Dle technologických postupů jsou kadavery ukládány do označeného kafilevního mrazicího boxu. Poté jsou odváženy asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu, ASANACE, s.r.o. Medlov. Opětovné použití zvířat není plánováno.

**Uplatňování 3R**

**Nahrazení používání zvířat**

Navrhované schéma pokusu nelze nahradit jiným modelem, nelze provést na buněčném ani jiném modelu, neboť sledujeme patofyziologickou odpověď celého organismu. Alternativní modely nám neumožňují sledovat růst nádoru a změny jeho mikroprostředí, interakci nádoru s hostitelem, ani vliv léčby na nádor. Některé dílčí experimenty (např. stanovení protinádorového efektu léčiv) budou částečně nahrazeny experimenty in vitro, což umožní snížit potřebu pokusných zvířat.

**Omezení používání zvířat**

Plánování experimentů předcházelo důkladné studium již publikovaných vědeckých výsledků, aby se předešlo opakováním experimentů a nadměrné spotřebě zvířat. Zvířata budou používána v minimálních počtech, které umožní statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami. Pokud to bude možné, tak budou sdíleny vzorky získané v experimentech. Analýzou většího počtu parametrů najednou (použití moderních, citlivých metod) docílíme další redukce potřebného počtu zvířat.

**Šetrné zacházení se zvířaty**

Veškerá manipulace se zvířaty bude co nejohleduplnější a co nejméně narušující přirozené potřeby zvířat.

**Použité druhy zvířat - vysvětlení**

Myši inbredního kmene BALB/c jsou vhodnými modely pro studium experimentálních myších nádorů. Myši imunodeficientní (athymické nu/nu myši) jsou vhodné pro analýzu růstu nádorů a vlivů léčby bez účasti imunitního systému hostitele. Imunodeficientní myši mohou navíc sloužit jako hostitelé pro nádory lidského původu (xenografty).