

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Experimentální terapie akutní myeloidní leukémie založená na inhibici FLT3-ITD/CDK4 na myších modelech

Doba trvání projektu pokusů v měsících

24

Klíčová slova

akutní myeloidní leukémie

experimentální terapie

FLT3-ITD

CDK4

inhibitor

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Rakovina u lidí [PT21]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Myší modely založené na xenotransplantaci nádorových buněk do imunodeficientních myší se v posledních několika letech staly standardem onkologického výzkumu. Myší modely mají řadu nesporných výhod oproti in vitro pokusům, neboť umožňují preklinické in vivo testování na vysoce relevantních myších modelech.

Akutní myeloidní leukémie (AML) patří mezi závažná hematologická onemocnění provázená nekontrolovanou proliferací myeloidních hematopoetických progenitorů v kostní dřeni. Léčba AML je obvykle založena na klasické cytotoxické chemoterapii, která je ovšem jen omezeně účinná. V poslední době jsou nicméně vyvíjeny preparáty blokující onkogenní signální dráhy, např. ty spojené s kinázou FLT3. Inhibice této kinázy experimentálními inhibitory (midostaurin, quizartinib, tandutinib) u AML sice vykazuje klinicky lepší výsledky, ale její účinnost je také omezená. Mezi další intenzivně zkoumané preparáty patří nízkomolekulární sloučeniny, které simultánně inhibují FLT3 a některou z dalších onkogenních kináz, například CDK4 a CDK9 (Mol Cancer Ther. 2015 Feb;14(2):375-83; Expert Opin Investig Drugs. 2019 Nov;28(11):989-1001; J Med Chem. 2018 Feb 22;61(4):1499-1518).

Nedávno jsme identifikovali silné duální inhibitory FLT3/CDK s vysokou selektivitou k AML s aktivním FLT3 onkogenem. V rámci

Potenciální přínosy projektu pokusů

Navržené experimenty povedou k ověření předpokládaného protinádorového účinku nově syntetizovaných inhibitorů kináz. Pro účely dalšího vývoje těchto látek jako potenciálních protinádorových chemoterapeutik a zejména pro možnost společného vývoje s komerční sférou a případnou komercializací je nezbytné prokázat účinnost vyvíjených inhibitorů v racionálně zvolených zvířecích modelech nádorových onemocnění. Výsledky mohou přispět k rozvoji nových terapeutických přístupů v onkologii.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Jednorázová podkožní aplikace leukemických buněk. Léčba myší s etablovanými tumory: 2-3 týdny. Léčebné postupy: quizartinib (10mg/kg intraperitoneálně e.o.d.), 1-3 experimentální sloučeniny (1-20 mg/kg, intraperitoneálně e.o.d.). Chirurgické zákroky nejsou plánovány.

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

Podkožní aplikace leukemických buněk je spojena s jejich růstem 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	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	0	120	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

Všechna zvířata budou na konci experimentu utracena. Jejich opakované použití není možné.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Pro plánované experimenty byl vybrán kmen imunodeficientních myší, který umožňuje xenotransplantaci leukemických buněk a následnou léčbu myší pomocí experimentálních léčebných postupů. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické in vivo testování (ověření) účinnosti nových protinádorových látek před tím, než budou testovány v rámci klinických studií na pacientech. Většinu protinádorových léčiv lze pouze omezeně testovat in vitro, jejich plnou protinádorovou účinnost lze preklinicky testovat pouze in vivo 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

Počty pokusných zvířat a jejich rozdělení do skupin budou navrženy tak, aby minimalizovaly jejich počet a zároveň umožnily získat statisticky průkazná data. Pro experimenty se zvířaty budou vybrány 1-3 připravené inhibitory, které budou mít co nejvyšší účinnost v předcházejících buněčných modelech in vitro. Omezeně účinné inhibitory nebudou zvířatům podávány. Navrhované sloučeniny nebyly dosud testovány in vivo. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací (Pubmed, Scifinder CAS, Patent Scope) naposledy v únoru 2021. Tumory a vybrané orgány z pokusných myší budou zamrazeny za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.

Celkový plán počtu použitých pokusných zvířat je stanoven s ohledem na rozsah a nutnost opakování z důvodu heterogenity fenotypu použitého kmene, individuální odezvy na xenotransplantaci lidských nádorových buněk i z důvodu nutnosti opakování následných in vitro analýz. Jednotlivé pokusy budou probíhat striktně v souladu s dodržováním pravidla 3R a experimentální zvířata budou vydávána jen proti platnému projektu pokusu.

Šetrné zacházení se zvířaty

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 krevetvorných buněk je pro imunodeficientní myši netoxická. Experimentální léčba na myších modelech založených na xenotransplantaci primárních leukemických buněk představuje uznávanou preklinickou alternativu k léčbě pacientů s daným typem nádorového onemocnění. Podkožní tumory jsou (ve srovnání se systémovými modely diseminovaných nádorů založenými na intravenózní xenotransplantaci leukemických buněk) pro myši šetrnější, neboť nevedou k hubnutí, alternaci celkového stavu či pre-terminální paralýze.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

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) jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity, což umožňuje připojení (xenotransplantaci) lidských leukemických buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 120 myší (dospělých samic).