

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569**Název projektu pokusů****Experimentální terapie lymfomu z plášťových buněk založené na inhibici cyklin-dependentních kináz v kombinaci s venetoclaxem na myších modelech**

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

27 měsíců

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Malignant lymphomas, patient-derived xenograft (PDX), cyclin-dependent kinase inhibitors, BCL2 inhibitors, daratumumab

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
- ☐ jiné zkoušení účinnosti a tolerance
- ☐ 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 lymfomových buněk do imunodeficientních myší se v posledních několika letech staly standardem výzkumu biologie lymfomů. Myší modely mají řadu nesporných výhod oproti in vitro pokusům, neboť umožňují preklinické in vivo testování na vysoce relevantních myších modelech odvozených přímo od pacientů (tzv. patient-derived lymphoma xenografts, PDX). Mantle cell lymfom (MCL) je agresivní podtyp ne Hodgkinského B-lymfomu. MCL je dosud považován za nevyléčitelné onemocnění. Burkittův lymfom je vysoce agresivní typ ne Hodgkinského lymfomu. Prognóza pacientů, u kterých dojde k návratu (relapsu) Burkittova lymfomu, je extrémně špatná. Inhibitory cyklin-dependentních kináz představují novou skupinu látek v experimentální léčbě ne Hodgkinských lymfomů, zejména lymfomu z plášťových buněk a Burkittova lymfomu, u nichž byla prokázána aberantní exprese cyklinu D1, resp. cyklinu D3. Inhibitor BCL2 venetoclax je schválen k léčbě chronické lymfatické leukémie a klinicky se testuje u lymfomu z plášťových buněk. Inhibitor MCL1 s názvem S63845 je nová protinádorová látka. Anti-CD38 monoklonální protilátka daratumumab je schválená v terapii mnohočetného myelomu a testuje se u dalších hematologických malignit. Na základě in vitro dat plánujeme na panelu vybraných PDX modelů odvozených od pacientů s lymfomem z plášťových buněk provést in vivo konfirmaci protilymfomového účinku látky palbociclib (inhibitor CDK4/6) a dinaciclib (inhibitor CDK2/7/9) v monoterapii a v kombinaci s inhibitorem BCL2 venetoclaxem na vybraných modelech lymfomu z plášťových buněk. Na základě in vitro dat plánujeme na panelu vybraných PDX modelů Burkittova lymfomu ověřit in vivo protinádorový účinek palbociclibu v monoterapii a v kombinaci s inhibitorem MCL1 S63845 a anti-CD38 protilátkou daratumumab.

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 časných klinických studií u pacientů s relabovanými formami lymfomu z plášťových buněk a Burkittova lymfomu.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

Jednorázová podkožní aplikace lymfomových buněk. Léčba myší s etablovanými lymfomy: 2 týdny. Léčebné postupy: venetoclax a palbociclib: orálně (sondou) 1 x denně, dinaciclib: intraperitoneálně 1 x týdně, daratumumab: intraperitoneálně 2 x týdně. Léčebné chirurgické zákroky nejsou plánovány.

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	Odhado- vaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Zvolte položku.	480			480	
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 - uveďte

Všechny zvířata budou na konci experimentu utracena.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu

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 in vivo testování (ověření) účinnosti nových protinádorových léčiv před tím, než budou testována v rámci klinických studií na pacientech. Většinu protinádorových látek 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 - vysvětlíte, 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).

Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů testovaných agresivních lymfomů (7 různých PDX modelů). Navrhované kombinace nebyly dosud testovány na modelech mantle cell lymfomu či Burkittova 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.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte 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

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.

Použité druhy zvířat - vysvětlíte 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 (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. 480 myši (8-16 týdnů starých 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