

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Experimentální terapie lymfomu z pláštěvých buněk založená na kombinované inhibici apoptotických drah na myších modelech	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	24 měsíců
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Mantle cell lymphoma, patient-derived xenografts (PDX), apoptosis, venetoclax, TRAIL
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 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). Lymfom z pláštěvých buněk patří mezi agresivní ne Hodgkinské lymfomy, které nelze vyléčit za použití standardních chemoterapeutických postupů. U MCL jsou nacházeny rekurentní defekty ve vnější a vnitřní apoptóze, včetně zvýšené exprese anti-apoptotického proteinu BCL2. Inhibitor BCL2 proteinu venetoclax se v současné době intenzivně testuje v kombinované léčbě MCL. S63845 a AA11554463 jsou specifické inhibitory anti-apoptotických proteinů MCL1 a BCL-XL. TRAIL patří mezi tzv. death ligandy, využívané imunitním systémem pro cílenou eradikaci nádorových buněk. Prokázali jsme, že získaná rezistence MCL buněk na venetoclax je způsobena zvýšenou expresí anti-apoptotických proteinů MCL1 a BCL-XL. Dále jsme prokázali in vitro protinádorový synergismus mezi venetoclaxem a TRAIlem (TNF-related apoptosis-inducing ligand). V předkládaném projektu plánujeme na panelu 3 PDX modelů odvozených od pacientů s MCL provést in vivo confirmaci protilymfomového účinku vybraných kombinací inhibitorů apoptotických drah. Hodláme testovat jednak kombinovanou blokádu BCL2 a BCL-XL (pomocí venetoclaxu a AA1155463), BCL2 a S63845 (pomocí venetoclaxu a S63845), jednak kombinovanou blokádu všech tří klíčových anti-apoptotických proteinů BCL2, BCL-XL a MCL1 (pomocí venetoclaxu, AA1155463 a S63845). Dále plánujeme in vivo confirmaci experimentální léčebné kombinace venetoclax + TRAIL (tj. kombinovaná blokáda vnější a vnitřní apoptotické dráhy). Tři různé PDX modely představují zcela minimální počet modelů nutných pro relevantní in vivo confirmaci - menší počet by nebyl s ohledem na genetickou heterogenitu MCL dostatečně průkazný. Experimenty provedené na 3 modelech poskytnou pilotní informace stran efektivity navrhované kombinace na patientských buňkách. Případné korelace s prediktivními faktory odpovědi na léčbu by vyžadovali mnohem větší počet experimentů na výrazně vyšším počtu PDX modelů. Experimentální kohorty budou čítat 10 zvířat, neboť 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 $> 60\%$ ve vypočítaných objemech tumorů mezi léčenou a neléčenou skupinou. Celkový maximální počet zvířat v navrhovaném experimentu tudíž dosáhne počtu 330.	
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 pláštěvých buněk.

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 myši s etablovanými lymfomy: 2 týdny. Léčebné postupy: venetoclax (100mg/kg 1 x denně per os), A1155463 (5mg/kg 1 x denně i.p.), S63845 (25mg/kg 1 x denně i.p.), TRAIL 80mg/kg i.v. jednorázově v den 3. 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	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	330			330	
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

Všechna 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 kmen imunodeficientních myši, který umožňuje xenotransplantaci lidských lymfomových buněk a následnou léčbu myši nesoucích lidský lymfom 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 - 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).

Navrhované experimentální imunoterapeutické postupy budou validovány na 3 různých PDX modelech MCL. Navrhované kombinace nebyly dosud u MCL 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 případný 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 - 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 (NOD-SCID-gamma) jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity, což umožňuje přihojení (xenotransplantaci) lidských lymfomových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 330 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