

| NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ | |
|---|--|
| Název projektu pokusů | |
| Experimentální terapie maligních lymfomů pomocí cílené inhibice onkogenních PIM kináz vysoce specifickým inhibítorem AZD1208 na myších modelech | |
| Doba trvání projektu pokusů | 2 roky (do 31.12.2021) |
| Klíčová slova - maximálně 5 | Maligní lymfomy, patient-derived xenograft (PDX), PIM kinázy, AZD1208, ibrutinib |
| Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka | |
| | základní výzkum |
| <input checked="" type="checkbox"/> | translační nebo aplikovaný výzkum |
| | vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků |
| | ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat |
| | zachování druhů |
| | vyšší vzdělávání nebo odborná příprava |
| | trestní řízení a jiné soudní řízení |
| Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby) | |
| <p>Myší modely založené na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk do imunodeficientních myší (tzv. <i>patient-derived xenografts</i>, 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 <i>in vivo</i> testování zahrnuje řadu klíčových parametrů (vztahy s mikroprostředím, hypoxie, metabolické změny, farmakokinetika), které v <i>in vitro</i> systémech testovat vůbec nelze. Maligní lymfomy představují nejčastější typ hematologických malignit v České republice. U části pacientů se nedaří lymfom vyléčit za použití standardních léčebných postupů, což vyžaduje testování nových protilymfomových látek. Některé vědecké práce naznačují, že na návratu (relapsu) některých typů lymfomů se může podílet zvýšená aktivita onkogenních kináz PIM1/2/3. PIM1 a PIM2 patří mezi nejčastěji mutované geny u difuzního velkobuněčného B-lymfomu. I lymfomu z plášťových buněk korelovala nadměrná exprese PIM1 s kratším přežitím. V předkládaném projektu hodláme testovat experimentální léčebné strategie zaměřené na cílenou inhibici PIM kináz specifickým inhibítorem AZD1208. <i>In vivo</i> pokusy budou provedeny jako konfirmace <i>in vitro</i> pokusů s příslušnými inhibitory (tj. AZD1208 a ibrutinibem) na buněčných liniích. <i>In vitro</i> jsme prokázali významný protinádorový synergismus mezi AZD1208 a ibrutinibem na lymfomových liniích. Pokusy budou provedeny na vybraných myších PDX modelech agresivních lymfomů (mantle cell lymfom, difuzní velkobuněčný B-lymfom). Léčba bude probíhat pomocí inhibitoru PIM1/2/3 kináz AZD1208, inhibitoru Brutonovy tyrozin-kinázy ibrutinibu a kombinací obou léčiv. Ibrutinib (Imbruvica) je schválen k léčbě chronické lymfatické leukémie a lymfomu z plášťových buněk. Nadějně výsledky prokázal u difuzního velkobuněčného lymfomu s tzv. non-germinal center imunofenotypem. Inhibitor AZD1208 je proprietární látka vyvinutá firmou Astra Zeneca se známým dávkováním na myších.</p> | |
| Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít) | |
| Preklinické zdůvodnění pro design klinické studie fáze 1/2 testující účinek specifického inhibitoru AZD1208 v kombinaci s ibrutinibem u vybraných typů agresivních lymfomů. | |
| Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá | |
| 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 (<i>NOD-SCID-gamma</i>) a NOD-RAG myši jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity, což umožňuje přihojení (xenotransplantaci) nádorových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 300 myší (dospělých samic) . | |
| Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu? | |
| 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 2cm, 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. Proto není plánováno použití anestezie či analgezie. Navrhovaná míra závažnosti je tudíž 2 (střední). | |
| Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement) | |
| Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat. | |
| Pro plánované experimenty byl vybrán model imunodeficientní laboratorní myši, která umožňuje přihojení, růst a následnou léčbu lidských lymfomových buněk. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické <i>in vivo</i> testování (ověření) účinnosti a/nebo biodistribuce nových protinádorových léčiv před tím, než budou testována v rámci klinických studií na pacientech. Většinu protinádorových látek 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: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů hematologických malignit. Navrhované kombinace nebyly dosud testovány na myších PDX modelech agresivních lymfomů. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v srpnu 2019. 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. Plasma, tumory a vybrané orgány z pokusných myší budou zamraženy za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

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.