

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Směřovaná polymerní léčiva konjugovaná s monoklonálními protilátkami pro cílenou dopravu protinádorových cytostatik v experimentální léčbě hematologických malignit na myších modelech	
Doba trvání projektu pokusů	2 roky (od schválení projektu do 31.12.2020)
Klíčová slova - maximálně 5	Hematologic malignancies, targeted drug delivery, HPMa-based copolymers, nanomedicine, patient-derived xenografts (PDX)
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
☐	základní výzkum
☒	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)	
Hematologické malignity (leukémie, lymfomy) představují 6. nejčastější typ nádorového onemocnění v České republice. U části pacientů se nedaří leukémii či lymfom vyléčit za použití standardních léčebných postupů, což vyžaduje testování nových protilymfomových látek. Cílem projektu je využít myší modely hematologických malignit odvozených od pacientů (tzv. patient-derived xenografts, PDXs) pro preklinické testování protinádorové účinnosti a farmakokinetických parametrů cytostatik doxorubicinu a cytarabinu vázaných na biokompatibilní polymery směrované pomocí monoklonálních protilátek. Biokompatibilní kopolymery na bázi N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidu (HPMA) jsou dobře rozpustné ve vodě, což umožňuje bezproblémovou i.v. či i.p. aplikaci. Protinádorová aktivita jednotlivých léčebných strategií bude sledována mírou potlačení růstu podkožně rostoucích PDX tumorů po jednorázovém podání polymerního léčiva. Na základě průkazně vyšší protinádorové účinnosti klinicky používaných konjugátů cytostatik a monoklonálních protilátek, tzv. <i>antibody-drug conjugates</i> (ADC), např. brentuximab-vedotin (anti-CD30 + monomethyl auristatin E) nebo polatuzumab-vedotin (anti-CD79b + monomethyl auristatin E) očekáváme signifikantně vyšší protinádorovou účinnost směrovaných polymerních léčiv ve srovnání s polymerními léčivy nesměrovanými. Kromě vyšší protinádorové účinnosti předpokládáme také sníženou toxicitu směrovaných polymerních léčiv, neboť k uvolňování cytotoxických látek by mělo docházet preferenčně v místě rostoucího tumoru. Pro každé testované cytostatikum (tj. jak pro doxorubicin, tak pro cytarabin) budou experimenty provedeny na 6 různých myších PDX modelech vybraných na základě exprese antigenů CD20, CD19, CD38 a CD79a. Ve vybraných případech bude provedena analýza biodistribuce podaného polymerního léčiva. Pro účely biodistribuce bude připravena speciální šarže polymerního léčiva s navázaným fluorescenčním barvivem, např. cyaninem 7 (Cy7). V definovaných intervalech po i.v. aplikaci značeného polymerního léčiva bude měřena fluorescence podkožního tumoru pomocí fluorescenční kamery ImageStream. Pro potřeby snímání fluorescence budou myši uvedeny do krátkodobé celkové anestezie směsí vzduchu a izofluranu.	
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 výsledky mohou být využity pro design časných klinických studií u pacientů s refrakterními formami hematologických malignit.	
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 přijetí (xenotransplantaci) nádorových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 1000 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 přesáhne 2cm, není růst takto malého tumoru v podkoží spojen s bolestí, dyskomfortem či hubnutím experimentálních zvířat. Aplikace všech léčiv v plánovaných dávkách není spojena se systémovou toxicitou vůči zdravým myším tkáním. Při měření na zobrazovacích přístrojích (fluorescenční kamery) budou zvířata celou dobu zahřívána na normální tělesnou teplotu a ventilována směsí vzduchu a isofluranu. Navrhovaná míra závažnosti je 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 přijetí, růst a následnou léčbu lidských lymfomových buněk. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické in	

vivo 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 *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, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů hematologických malignit (plánováno 6 různých PDX modelů). Polymerně-vázaná cytostatika jsou unikátní, patentově chráněné látky, které dosud nebyly testovány na modelech PDX. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v září 2018.

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

Vysvětlíte 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.