

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Experimentální terapie maligních lymfomů pomocí nové monoklonální protilátky MOR208/tafasitamab na myších modelech	
Doba trvání projektu pokusů	3 roky (do 31.12.2022)
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	Maligní lymfomy, patient-derived xenograft (PDX), rituximab,
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
	<input type="checkbox"/> základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> translační nebo aplikovaný výzkum
	<input type="checkbox"/> vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	<input type="checkbox"/> ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	<input type="checkbox"/> zachování druhů
	<input type="checkbox"/> vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	<input type="checkbox"/> 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 myši (tzv. <i>patient-derived xenografts</i>, PDX) se v posledních několika letech staly standardem testování či ověřování preklinických experimentálních léčebných postupů v hematonekologii. 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. Od roku 1997 byla schválena v léčbě CD20+ B-lymfomů terapeutická monoklonální protilátka anti-CD20 rituximab. Bohužel, lymfomové buňky v době návratu (relapsu) lymfomu jsou často CD20-negativní. Proto se testují nové terapeutické monoklonální protilátky cíleně rozpoznávající nové povrchové antigeny. V předkládaném projektu hodláme testovat novou terapeutickou monoklonální protilátku anti-CD19 s názvem MOR208/tafasitamab vyvinutou firmou MorphoSys. Pokusy budou provedeny na vybraných myších PDX modelech agresivních lymfomů. V pilotních experimentech bude léčba probíhat pomocí protilátky MOR208/tafasitamab v monoterapii a v kombinaci s anti-CD20 rituximabem. Ve vybraných experimentech bude myším navíc aplikována imunomodulační látka lenalidomid (Revlimid). MOR208/tafasitamab je patentově chráněná terapeutická monoklonální protilátka proti CD19 antigenu se známým dávkováním na myších. Lenalidomid (Revlimid) je imunomodulační látka používaná v klinické hematonekologii k léčbě pacientů s mantle cell lymfomem a mnohočetným myelomem. Kombinace lenalidomidu a rituximabu vede u pacientů k posílení protinádorového efektu protilátky díky aktivaci buněčných komponent protinádorové imunity podílejících se na tzv. ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), především natural killer (NK) buněk a makrofágů. Stejný efekt se předpokládá také u kombinace MOR208/ tafasitamab a lenalidomidu. Vzhledem k tomu, že imunodeficientní myši vykazují defekty v buněčných složkách protinádorové imunity a Fc fragmenty protilátek rituximab a tafasitamab jsou lidské, bude v případě experimentů zahrnujících léčbu imunomodulační látkou lenalidomid použito postupu xenotransplantace směsi PDX buněk a periferních mononukleárních buněk (PBMC) izolovaných z krve zdravých dárců (20mL).</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 nové terapeutické monoklonální protilátky MOR208/ tafasitamab (+/- lenalidomid) u vybraných typů ne Hodgkinsonských 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. 1200 myši (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: Uved'te, 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	

in vivo testování (ověření) účinnosti nových terapeutických monoklonálních protilátek 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: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů hematologických malignit (10 různých PDX modelů odvozených reprezentujících hlavní typy agresivních lymfomů). 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 $> 60\%$ ve vypočítaných objemech tumorů mezi léčenou a neléčenou skupinou. Plasma, tumory a vybrané orgány z pokusných myší budou zamrazeny 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.