

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Karakterizacija novih tumorskih cjepiva utemeljenih na CMV-u kao vektoru		
Trajanje projekta	10.11.2014.-09.11.2019. * pokusi koji uključuju laboratorijske životinje provode se od 2015. godine do 09.11.2019.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Citomegalovirus, tumori, tumorska cjepiva, aktivacijski receptori, vektorska cjepiva		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Nedavno smo otkrili da rekombinantni mišji citomegalovirus (MCMV) koji ispoljava stanični ligand za aktivacijski NKG2D receptor unatoč jakoj atenuiranosti posjeduje izvanrednu sposobnost povećavanja učinkovitosti i duljine trajanja specifičnog imunološkog odgovora posredovanog CD8 limfocitima T (Slavuljica et al., J Clin Invest, 2010). Također smo pokazali da kada u ovakav rekombinantni virus ubacimo i CD8 epitop listeriolizina O (LLO) <i>L. monocytogenes</i> dobijemo ne samo CD8 odgovor koji je puno snažniji od odgovora na isti virus koji ne nosi ligand za aktivacijski NKG2D receptor, već i da su CD8 limfociti inducirani ovakvim vektorom snažno protektivni, to jest da životinje imunizirane ovakvim vektorom mogu podnijeti puno veću dozu <i>L. monocytogenes</i> u odnosu na kontrolne životinje imunizirane vektorom bez ugrađenog NKG2D liganda (Trsan et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2013). Cilj ovog projekta je na mišjem modelu istražiti protektivni učinak protutumorskih vektorskih cjepiva baziranih na rekombinantnom MCMV-u koji ispoljava stanični ligand za aktivacijski NKG2D receptor te pojedine tumorske antigene.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Već dugi niz godina naša se istraživačka grupa bavi imunobiologijom i patogeneom citomegalovirusne (CMV) infekcije na animalnom modelu infekcije miševa mišjim citomegalovirusom (MCMV). Nedavno smo otkrili da rekombinantni MCMV koji ispoljava stanični ligand za aktivacijski NKG2D receptor unatoč jakoj atenuiranosti posjeduje izvanrednu sposobnost povećavanja učinkovitosti i duljine trajanja specifičnog imunološkog odgovora posredovanog CD8 limfocitima T (Slavuljica et al., J Clin Invest, 2010; Trsan et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2013). CMV-i izuzetno dobro potiču CD8 T limfocitni odgovor unatoč razvijenim brojnim imunosupresivnim mehanizmima usmjerenim protiv antigenske prezentacije putem MHC I molekula (Reddehase, Nat Rev Immunol, 2002). CMV prvenstveno potiče nastajanje efektorskih memorijskih CD8 limfocita T (Lemmermann et al., Vir Res, 2011). Uz to, CMV aktivira tkivno specifične memorijske CD8 T limfocite sluznice, što može biti od osobite važnosti za terapijsku kontrolu tumora. Prikladnost CMV-a kao vektora za cjepiva dodatno je naglašena nedavnim istraživanjem Hansena i kolega (Hansen et al., Science, 2013). Učinkovit anti-tumorski imuni odgovor je usmjeren na tumorske antigene (TAA) ili na proteine onkogenih virusa jedinstvenih za tumore, tzv. tumor-specifične antigene (TSA) (pregled u Schabowsky et al., Exp Mol Pathol, 2009). Unatoč činjenici da je moguće inducirati		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	učinkovit anti-tumorski imuni odgovor, većina imunoterapija usmjerena na odbacivanje tumora nije uspješna (pregled u (Schreiber et al., Science, 2011)). Razlog neuspjeha imunoterapije je slaba imunogeničnost tumorskih antigena kao posljedica tolerancije na vlastite antigene (Morgan et al., Science, 2006). Također, tumori su razvili različite mehanizme za imunomodulaciju urođene i stečene imunosti (Jenkins et al., J Exp Med, 1987). Iz navedenog, uspješan razvoj vakcinskih strategija za liječenje i prevenciju tumora mora se bazirati na prezentaciji tumorskih antigena koji neće samo inducirati i pojačati tumor-specifični imuni odgovor, nego i omogućiti stvaranje imunog odgovora u uvjetima tumorske imunomodulacije. U našem istraživanju planiramo karakterizirati nova vektorska cjepiva bazirana na CMV-u koja izražavaju NKG2D ligand, a usmjerena protiv različitih tumora, te ispitati njihovu efikasnost u induciranju antitumorskog odgovora. Temeljem prethodno navedenog i naših prethodnih rezultata, očekujemo da će naše vakcine biti izuzetno uspješne u induciranju protutumorskog imunog odgovora te tako predstavljati potpuno novi pristup u dizajniranju protutumorskih vakcina.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju je 2.000.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinjama će biti injicirane tumorske stanice te će profilaktički ili terapijski biti imunizirane MCMV-om. U određenom vremenskom periodu nakon infekcije bit će usmrćene, a njihovi organi/stanice/tkiva/tumor analizirani. Pojedinih grupama životinja će biti injicirana protutijela u svrhu deplecije/blokade pojedinih staničnih populacija/receptora, a pojedinih miševima će se zbog potrebe dobivanja seruma uzimati mala količina krvi iz repne vene. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon navedenih tretmana, te će se životinje pratiti. Kao posljedica rasta tumora očekujemo da će za određeni broj životinja težina pokusa biti umjerena – stoga će miševi biti svakodnevno praćeni sukladno obrascu u točki 4.11.5. Zahtjeva za odobrenje projekta te se neće čekati njihova smrt, već će ovisno o procjeni stanja biti usmrćeni na humani način. Očekivana razina težine postupka za miševima koji neće razviti tumor je blaga.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	CMV-i izuzetno dobro potiču CD8 T limfocitni odgovor, prvenstveno nastajanje efektorskih memorijskih CD8 limfocita T (Lemmermann et al., Vir Res, 2011). Uz to, CMV aktivira tkivno specifične memorijske CD8 T limfocite sluznice, što može biti od osobite važnosti za terapijsku kontrolu tumora. Prikladnost CMV-a kao vektora za cjepiva dodatno je naglašena nedavnim istraživanjem Hansena i kolega (Hansen et al., Science, 2013). U našem istraživanju životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda za istraživanje MCMV-a i HCMV-a, odnosno istraživanje učinka imunizacije vakcinskim protutumorskim vektorom i kompleksne interakcije komponenti imunološkog sustava i tumora. Imajući u vidu kompleksnost imunološkog sustava i međusobnih interakcija pojedinih njegovih komponenti, in vitro istraživanja ne mogu pružiti cjelokupnu sliku stvarnih zbivanja u organizmu tijekom imunološke reakcije na tumor te je neophodno istraživanje na životinjama.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pojedinim grupama životinja uključenim u istraživanje koristit će se najmanji mogući broj životinja koji omogućava dobivanje statistički relevantnih podataka.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se	Citomegalovirusi su specifični za vrstu, a infekcija miševa MCMV-om je najčešće korišteni model za izučavanje HCMV infekcije, s obzirom na veliku sličnost MCMV-a i HCMV-a u imunobiologiji i patogenezi. Stoga u našem istraživanju možemo koristiti samo predloženi mišji model. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.

do umjerena. Životinje će biti praćene svakodnevno sukladno obrascu u točki 4.11.5 Zahtjeva za odobrenje projekta, te u slučaju potrebe biti usmrćene na human način. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u kavezima smještenim u IVC sustave. Na kraju pokusa životinje će biti eutanazirane na human način.