

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Augmenting and broadening T-cell responses to glioblastoma therapeutic vaccine platform based on HCMV expressing NKG2D ligands - GLIOVACC		
Trajanje projekta	01.03.2018. -- 31.08.2020. odnosno od datuma izdavanja odobrenja ukoliko odobrenje bude izdano poslije 01.03.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Citomegalovirus, humanizirani miš, glioblastom, 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 virus ubacimo i druge antigene dobijemo dodatni zaštitni učinak cjepiva (Trsan et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2013; Trsan et al., Eur J Immunol, 2017). Cilj ovog projekta je provesti provjeru inovativnog koncepta za cjepivo u kojem se spajaju dva modela antitumorskog cjepiva, jedan na CMV antigene i drugi na tumorske antigene.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Već dugi niz godina naša se istraživačka grupa bavi imunobiologijom i patogenezoj citomegalovirusne (CMV) infekcije na animalnom modelu infekcije miševa MCMV-om. CMV-i izuzetno dobro potiču CD8 T limfocitni odgovor unatoč razvijenim brojnim imunosupresivnim mehanizmima usmjerenim na antigensku prezentaciju putem MHC I molekula (Reddehase, Nat Rev Immunol, 2002). Prikladnost CMV-a kao vektora za cjepiva dodatno je naglašena nedavnim istraživanjem Hansena i suradnika (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 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 suprotstaviti se mehanizmima kojih tumori slabe imuni nadzor. U našem istraživanju planiramo karakterizirati nova vektorska cjepiva bazirana na CMV-u koja izražavaju NKG2D ligand, a usmjerena su protiv dva antigena specifična za primarni tumor mozga – glioblastom multiforme, te ispitati njihovu efikasnost u induciranju antitumorskog		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	odgovora. Temeljem navedenog i naših prethodnih rezultata, očekujemo da će naša vakcina biti uspješna u induciranju protutumorskog imunog odgovora te tako predstavljati 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 500.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	S obzirom da je vektor virus specifičan za čovjeka, testiranje na životinjama će se provoditi na miševima s humanim imunološkom sustavom. Navedeni miševi proizvedeni su injiciranjem humanih limfocita iz krvi u mišji soj NSG kojem nedostaju imunološke stanice. Životinjama će biti injicirane tumorske stanice, a prethodno će profilaktički biti imunizirane integriranim cjepivom baziranom na humanom CMV-u. U određenom vremenskom periodu nakon infekcije bit će usmrćene, a njihovi organi/stanice/tkiva/tumor analizirani. Pojedinih miševima će biti injicirana protutijela za depleciju pojedinih tipova limfocita (CD8, CD4, NK) ili za blokadu određenih inhibicijskih receptora (PD1, CTLA-4, TIGIT). 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 teška – stoga će miševi biti svakodnevno praćeni te se neće čekati njihova smrt, već će ovisno o procjeni stanja ukoliko bude potrebno biti usmrćeni na humani način. Očekivana razina težine postupka za mišveve koji neće dobiti tumorske stanice je umjerena.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	U našem istraživanju životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda za istraživanje 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 poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Citomegalovirusi su specifični za vrstu, a infekcija miševa s rekonstituiranim humanim imunološkim odgovorom je jedini način testiranja virusa specifičnog za čovjeka, stoga u našem istraživanju možemo koristiti samo predloženi mišji model. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je umjerena do teška. Životinje će biti praćene svakodnevno 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.