

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 97/2020

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Výzkum užití nových lipidických nanočástic obsahující nukleovou kyselinu k produkci protilátek a imunizaci

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 57 (do 1.10.2025)

Klíčová slova - *maximálně pět* 1) imunizace, mRNA, lipidické nanočástice, vakcinace

Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

- | | |
|-------------------------------------|---|
| ☐ | základní výzkum |
| ☒ | translační a aplikovaný výzkum |
| ☐ | kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže) |
| ☐ | legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance |
| ☐ | a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie |
| ☐ | běžná výroba |
| ☐ | ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat |
| ☐ | zachování druhů |
| ☐ | vyšší vzdělávání |
| ☐ | odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí |
| ☐ | trestní řízení a jiné soudní řízení |
| ☐ | udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech |

Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

Cílem tohoto projektu je evaluace imunogenity těchto částic po různých způsobech podání (a tím i cílení buněk imunitního systému v různých kompartmentech) stran jak případného technologického využití pro rychlou přípravu protilátek (bez nutnosti přípravy proteinového antigenu, např. pro přípravu diagnostik) - část A, tak i stran případného využití při aktivní imunizaci - část B.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišuje mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Část A: Protilátky jsou díky své specifické selektivní interakci s antigenem nezastupitelné v řadě analytických metod (i.e. ELISA, průtoková cytometrie, imunohistochemie) například při diagnostice onemocnění u lidí či zvířat, ale i v řadě průmyslových aplikací, či při sledování stavu životního prostředí. Krom analytických metod jsou používány protilátky i při terapii – např. v podobě antitoxinů proti řadě jedů, pasivní imunizaci v rámci infekčních onemocnění a v onkologii. Přínosem tohoto projektu může být nová účinná metoda přípravy protilátek pro použití viz. výše (diagnostika, analytické metody, antitoxiny...) bez nutnosti přípravy proteinového antigenu.

Část B: Aktivní imunizace/vakcinace je dosud jednou ze základních metod prevence jak infekčních onemocnění, tak i např. některých nádorových onemocnění. Jednou ze základních nevýhod standardně používaných metod imunizace je zdlouhavá a náročná produkce antigenu a také v řadě případů nutnost použití adjuvans. Užitím nanočástic nesoucích nukleovou kyselinu by tento proces mohl výrazně urychlit a usnadnit (není nutno připravovat purifikovaný antigen). V rámci projektu byl vytvořen nový typ lipidických nanočástic nesoucích nukleovou kyselinu s výrazně vyšší transfekční účinností a s afinitou k buňkám imunitního systému slibující efektivnější aktivaci imunitní odpovědi oproti jiným v současně dostupným lipoplexům. Z předběžných výsledků vyplývá, že po opakované aplikaci částic dochází k produkci protilátek.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

- imunizační postupy předpokládají aplikaci antigenu/nanočástic cestou intramuskulární, intravenózní, intraperitoneální, subkutánní či intradermální injekce (v celkové anestezii), event. perorální podání cestou sondy, event. intranasální podání, podání bude opakováno max. pětkrát, do jednoho zvířete jednom jednou cestou podání
- analýza imunitní odpovědi bude prováděna rozbořem odebrané krve z retroorbitálního plexu, vzhledem k max. počtu dávek lze předpokládat max. 6 odběrů na jedno zvíře

- terminální odběr kardiopunkcí v celkové anestezii – pro zajištění dostatečného množství materiálu pro analýzy

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

dopady mírné – mírná bolestivost po aplikaci injekce, pokles hmotnosti v důsledku celkové anestezie (korekce i.p. rehydrací) – max 48 hod, event. bolest po odběru krve retroorbitální cestou (korigováno lok. anestezií) – max. 24 hod, možné krátkodobé jednostranné zhoršení vizu po odběru – max. 24 hod, toxicita nanočástic v rámci předběžných experimentů v potřebných dávkách nebyla pozorována, teoreticky možné jsou autoimunitní projevy spíše mírného charakteru, kdy zvířata budou při jejich výskytu budou utracena pro podrobnější analýzu

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	880		880		
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu	0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - uveďte

Vzhledem k tomu, že všechna zvířata budou exponována antigenu, budou provedeny terminální odběry, nelez zvířata použít opakovaně.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu

V rámci nahrazení zvířat je použito *in vitro* testování nanočástic na cytotoxicitu, ostatní experimenty hodnotící imunogenicitu je nezbytné provést na zvířecích modelech, vzhledem k tomu, že studium imunitní odpovědi na antigen a testování nových imunizačních/vakcinačních protokolů nelze v současné době studovat alternativními přístupy. Při přípravě protilátek jsou dosud experimentální zvířata ve světě používána a tento postup dosud nebyl spolehlivě nahrazen *in vitro* přístupy. Možnosti využití alternativních metod byly čerpány z elektronických databází – pubmed, Web of science, Go3Rs, ECVAM/FRAME.

Omezení používání zvířat - vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).

Uvedený počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat. O průběhu a výsledcích všech provedených experimentů budou pečlivě vedeny protokoly, výsledky budou průběžně hodnoceny k optimalizaci experimentální strategie a snížení počtu potřebných experimentálních zvířat. Pro zajištění minimalizace počtu zvířat budou experimenty primárně provedeny nejprve v testovacích kohortách (3 jedinci). Pokud již na tomto množství nebude docházet k imunitní odpovědi, či dojde ke vzniku nežádoucích účinků, pokus bude ukončen. Až po dosažení dostatečné imunogenity testovaných substancí bude experiment doplněn do plného plánovaného počtu jedinců pro získání kvantitativních dat. Společné využití zvířat při tomto pokusu není možné vzhledem k imunitní paměti po aplikaci antigenu.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu

Se zvířaty bude nakládáno podle zásad bezbolestného zacházení se zvířaty, během experimentů bude zajištěn dostatek potravy a vody, při bolestivých zákrocích budou použita anestetika běžně užívaná u hlodavců ve veterinární medicíně. Během celkové anestezie bude pečováno o tepelnou pohodu zvířat. Pro

zmenšení pooperační bolestivosti bude při odběrech krve krom celkové anestezie i užito lokálního dlouhodobého anestetika. Technické vybavení užívané v experimentu odpovídá parametrům užívaným v humánní, resp. veterinární medicíně. Stav zvířat bude pravidelně kontrolován vedoucím pokusů, nebo jím pověřenou kvalifikovanou osobou, experiment bude ukončen při prvních klinických známkách zhoršení zdravotního stavu zvířete (např. klinické známky bolesti, změna chování, pokles hmotnosti atp.) tak, aby nedocházelo k jejich utrpení. Dodržování předpisů ochrany zvířat bude kontrolovat pravidelně vedoucí pokusů nebo jím pověřená kvalifikovaná osoba.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Myš byla vybrána z důvodů častého použití myších protilátek v rámci výroby protilátek. Myš jako modelový organismus splňuje blízkost k člověku (savec) a vykazuje dobré parametry (snadnost chovu, vysoká reprodukční schopnost, rozměry). Pro zhodnocení imunitní odpovědi budou použita dospělá zvířata tj. 12-40 týdnů.

- 1) Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu
- 2) Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „nespecifikovaného savce“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech