

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Biodistribution of AAV-based gene therapies in minipigs

Doba trvání projektu pokusů v měsících	27
Klíčová slova	genová terapie
scFv	neurodegenerace
neuromuskulární	AAV vektory

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0

Translační a aplikovaný výzkum: Nervové a duševní poruchy u lidí [PT24]

0

Cíle projektu pokusů

Cílem experimentální studie je na prasečím modelu zjistit koncentrace terapeutických protilátek v plazmě a různých oblastech mozku, periferní nervové soustavy a dalších orgánů a tkání po aplikaci AAV vektorů intratekálně nebo intravenózně.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Genová terapie protilátkami nesenými AAV se ukazuje být potenciální léčbou neurosvalových a neurodegenerativních onemocnění. Dostatečná biodistribuce AAV a tvorba protilátek v cílových orgánech je nezbytná pro léčebný přínos pacientům. Stanovení koncentrace terapeutických protilátek v plazmě a různých oblastech mozku, periferní nervové soustavy a dalších orgánů a tkání v tomto modelu umožní navržení dávkování a predikci farmakokinetiky genové terapie u lidských studií.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Opakovaný odběr krve a CSF ke stanovení bazálních hodnot biomarkerů a případných neutralizačních protilátek před aplikací terapeutických AAV vektorů.

V den podání terapeutických AAV odběr plazmy a CSF pro stanovení bazálních hodnot biomarkerů a samotné miniinvazivní (injekční) podání AAV vektorů intratekálně nebo intravenózně.

Následné opakované odběry krve a CSF ke stanovení AAV neutralizačních protilátek, stanovení biomarkerů, AAV genomových kopií a produkovaných scFv protilátek. Usmrcení a odběr krve, CSF a tkání post mortem. Celková doba experimentu od zahájení do usmrcení může být 1 až 4 měsíce.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Nejsou očekávány závažné nežádoucí účinky u zvířat. Klasifikace závažnosti je střední z důvodu provádění miniinvazivních zákroků v sedaci a opakovaných odběrů tekutin v sedaci. Všechny intervence a vyšetření budou probíhat v sedaci po premedikaci v kotci. Zvířata budou po podání terapeutických AAV dostávat po dobu 3 dní léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem Tramal, Vetalgin nebo Flunixin (i.m.). Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu bude zvířatům podáván Fentanyl nebo Tramal (i.m.) nebo budou bezodkladně utracena.

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

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
prasata (<i>Sus scrofa domesticus</i>) [A14]	0	0	40	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat			
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Po ukončení experimentů budou zvířata předávkována anestetikem a vykrvena a odebrány vzorky pro histologické analýzy.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Není možné nahradit jedince zvoleného experimentálního zvířecího druhu. Miniprasata byla vybrána z důvodu podobné velikosti mozku a míchy s člověkem. Pro dosažení terapeutického účinku léčby neurodegenerativních onemocnění je nutná odpovídající biodistribuce AAV v cílových oblastech mozku, míchy nebo svalu. Biodistribuce a farmakokinetika tak bude odhadnuta na velkém zvířeti s mozkem velikosti blízké mozku člověka. Výsledky experimentu na praseti jsou aplikovatelné pro lidské subjekty.				
Omezení používání zvířat				
Navržený počet zvířat ve skupině je nejnižší počet poskytující statisticky hodnotné výsledky s ohledem na variabilitu mezi zvířaty. Redukce použitých zvířat bude dosaženo odběrem a analýzou více tkání a orgánů, které vyloučí možnost provádění dalších doplňujících studií zaměřených na biodistribuci terapeutických látek a jejich případných negativních účincích na cílové a necílové tkáně.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Aplikace AAV konstruktů do intratekálního prostoru přes spinální jehlu tak jako aplikace AAV konstruktů do ušní vény jsou standardně miniinvasivní metodiky bez chirurgického přístupu a taky neočekáváme nějaké nežádoucí účinky aplikovaných nově testovaných AAV konstruktů. Během vystavení zákrokům budou zvířata uvedena do stavu mírné nebo hluboké sedace, přičemž po dobu sedace bude zajištěn jejich tepelný komfort. Po aplikaci AAV konstruktů budou zvířata pod kontinuální kontrolou až do úplného nabití vědomí. Následně budou navraceny do kotců. Prvních pět dní po zákroku budou zvířata sledována minimálně dvakrát denně. Po zákroku po dobu dalších tří dní budou zvířatům podávána analgetika. U zvířat se bude sledovat celkový zdravotní stav, chování, příjem potravy a vody. Pokud se tak ovšem stane a zvířata přestanou jíst (maximálně 5 dnů) nebo se u nich vyskytne nějaký druh neléčitelného patologického procesu, experimentální zvířata šetrně utratíme. Pro navození analgezie bude aplikován i.m. Tramal v čase AAV aplikace, a i.m. Vetalgín nebo i.m. Flunixin po AAV aplikacích. Po skončení zákroku budou zvířata umístěna do blízkosti tepelného zářiče a přikryto termofólií.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Miniaturní prase je charakterem tkání a anatomíí blízké podmínkám humánní medicíny. Pro stanovení biodistribuce AAV nesených protilátek ve velkém zvířecím modelu bylo zvoleno miniprase věku 5-12 měsíců na základě podobnosti genetického pozadí a velikosti orgánů s člověkem . Počet použitých zvířat (5 jedinců ve skupině) byl vypočítán na základě počtu experimentálních skupin, počtu zvířat ve skupinách (biologické repliky) a síly statistického testu. Celkově plánujeme použít 40 jedinců miniprasete.